ISBN 978-4-908553-02-8

海洋観測ガイドライン
第三巻
採水分析（溶存態）

日本海洋学会編

2015 年 9 月

This page left intentionally blank

序

気候変化に対する緩和策・適応策の策定が喫緊の課題とされており、海洋においても環境変化の実態を知ることの重要性が高まっている。全球規模での環境変化を監視するためには、適切な計測・分析標準のもとに、トレーサビリティや比較可能性（comparability）が確保され、かつ、その不確かさ（uncertainty）が明確にされているデータの公開が不可欠となることは言うまでもない。

近年では、各国の連携協力のもと、WOCE 測線の再観測によって海洋内部の変動に関する知見が蓄積され、気候変化に関する国際パネルの第5次評価報告書にその成果が引用されている。また、気候変動研究に用いる全ての測定値を完全に SI トレーサブルにするための対策が講じられるよう、国際度量衡会議から関係機関への勧告がなされている。さらに、栄養塩標準物質も普及しはじめている。このように、データの比較可能性やそれが鍵となる研究、標準物質に係る研究開発が進展している。

一方、観測や分析に用いられるガイドラインは、これらの進展を反映しているとは言い難い。我が国においては、気象庁が 1999 年に発行した「海洋観測指針」が比較的広く活用されていたが、その記述は必ずしも最新のものとは言えず、かつ、現在は入手困難である。2010 年には、WOCE マニュアルを改訂する形で、GO-SHIP 海洋観測マニュアル（IOCCP Report No.14, 2010）が発行されたが、これは外洋における Repeat Hydrography 用のもので、幅広いユーザーを想定したものではない。また、他にも種々のマニュアルやガイドラインが存在するが、あるものは日本語のみ、またあるものは英語のみ、といった状況であり、さらに、最新の内容とそうでないものが混在している。

この現状を踏まえ、日本海洋学会は、海洋観測ガイドライン編集委員会を発足させ、既存のガイドライン類を精査・整理し、必要な更新と不足を補って統合し、最新の海洋観測法や分析法を記載した「海洋観測ガイドライン」を発行し、日本海洋学会の Web ページにおいて広く公開することとした。

本ガイドラインは逐次更新することで、常に最新のものが利用できるようにすることを意図している。本ガイドラインが多くの観測者に用いられ、海洋学の進展に役立つことを期待している。

海洋観測ガイドライン編集委員会
委員長　河野　健

This page left intentionally blank

執筆者一覧

青山　道夫	福島大学環境放射能研究所/海洋研究開発機構 RCGC
荒巻　能史	国立環境研究所
石井　雅男	気象研究所
内田　裕	海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
梅澤　有	長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
太田　尚志	石巻専修大学
小川　浩史	東京大学大気海洋研究所
小澤　知史	マリン･ワーク･ジャパン
乙坂　重嘉	日本原子力研究開発機構
小畑　元	東京大学大気海洋研究所
帰山　秀樹	水産総合研究センター中央水産研究所
片山　健一	マリン･ワーク･ジャパン
河野　健	海洋研究開発機構
木津　昭一	東北大学 大学院理学研究科
熊本　雄一郎	海洋研究開発機構
纐纈　慎也	海洋研究開発機構 RCGC
小島　茂明	東京大学大学院新領域創成科学研究科／大気海洋研究所
小杉　如央	気象研究所
齊藤　宏明	東京大学大気海洋研究所
佐々木建一	海洋研究開発機構
笹野　大輔	気象研究所
佐藤　弘康	マリン・ワーク・ジャパン
佐藤　光秀	東京大学大学院農学生命科学研究科
須賀　利雄	東北大学大学院理学研究科
鈴木　亨	日本水路協会　海洋情報研究センター
鈴木　光次	北海道大学
髙谷　祐介	気象庁地球環境･海洋部
高槻　靖	気象研究所
千葉　早苗	海洋研究開発機構
豊田　威信	北海道大学
中岡　慎一郎	国立環境研究所
中野　俊也	気象庁 地球環境･海洋部
成田 尚史	東海大学海洋学部
橋濱 史典	東京海洋大学
林　和彦	気象庁 地球環境･海洋部
平譯　享	北海道大学大学院水産科学研究院

牧　　秀明　　国立環境研究所
松永　浩志　　マリン･ワーク･ジャパン
松本慧太郎　　マリン・ワーク・ジャパン
道田　豊　　東京大学大気海洋研究所国際連携研究センター
宮尾　孝　　気象庁 地球環境･海洋部
森田　貴己　　水産総合研究センター中央水産研究所
横川　太一　　海洋研究開発機構

査読者一覧

安藤　健太郎　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
石坂　丞二　名古屋大学
伊東　素代　海洋研究開発機構北極環境変動総合研究センター
植木　巌　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
植原　量行　東海大学海洋学部
牛尾　収輝　国立極地研究所・北極圏環境研究センター
内田　裕　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
梅澤　有　長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
太田　尚志　石巻専修大学　理工学部
長船　哲史　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
乙坂　重嘉　日本原子力研究開発機構
勝又　勝郎　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
粥川　洋平　産業技術総合研究所計量標準総合センター
川合　義美　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
川口　悠介　海洋研究開発機構北極環境変動総合研究センター
日下部　正志　海洋生物研究所
熊本　雄一郎　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
纐纈　慎也　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
後藤　浩一　環境総合テクノス
小林　大洋　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
小松　大祐　東海大学 海洋学部
齊藤　宏明　東京大学大気海洋研究所
笹岡　晃征　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
佐藤　光秀　東京大学大学院農学生命科学研究科
佐野　雅美　東京大学大気海洋研究所
重光　雅仁　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
下島　公紀　九州大学 カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所
清水　勇吾　水産総合研究センター中央水産研究所
須賀　利雄　東北大学大学院理学研究科地球物理学専攻
鈴木　光次　北海道大学大学院地球環境科学研究院
清家　弘治　東京大学大気海洋研究所
高槻　靖　気象研究所海洋・地球化学研究部
武田　重信　長崎大学水産学部
津田　敦　東京大学大気海洋研究所
時枝　隆之　気象大学校
中口　譲　近畿大学 理工学部
中野　俊也　気象庁 地球環境・海洋部
永野　憲　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
中山　典子　東京大学 大気海洋研究所

成田　尚史　　東海大学海洋学部
西岡　純　　北海道大学低温科学研究所
仁科　文子　　鹿児島大学水産学部
西野　茂人　　海洋研究開発機構北極環境変動総合研究センター
則末　和宏　　新潟大学理学部
橋濱　史典　　東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科
細田　滋毅　　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
松本　剛　　琉球大学
村田　昌彦　　海洋研究開発機構地球環境観測研究開発センター
山下　洋平　　北海道大学 地球環境科学研究院
横川　太一　　国立研究開発法人海洋研究開発機構
海洋生命理工学研究開発センター
吉川　久幸　　北海道大学
芳村　毅　　電力中央研究所環境科学研究所
渡邊　朝生　　水産総合研究センター東北区水産研究所

目次

	序		
	執筆者一覧		
	査読者一覧		
Vol. 1	品質管理と標準物質		
Chap. 1	観測量と国際単位系 SI	G101JP:001-007	青山道夫
Chap. 2	標準機器・標準物質による精度管理	G102JP:001-009	林和彦・内田裕・青山道夫
Chap. 3	全球海洋観測システム（GOOS）の必須海洋変数（Essential Ocean Variables）	G103JP:001-006	石井雅男・須賀利雄・千葉早苗
Chap. 4	項目間比較による精度管理	執筆中	内田裕・青山道夫・石井雅男
Chap. 5	データの公開と国際交換	G105JP:001-010	鈴木亨・道田豊
Chap. 6	国際海水熱力学方程式 2010（TEOS-10）	執筆中	内田裕ほか
Vol. 2	物理観測		
Chap. 1	採水	G201JP:001-019	中野俊也・小畑 元・片山健一・小澤知史・松永浩志
Chap. 2	水温	G202JP:001-002	中野俊也
Chap. 3	塩分	G203JP:001-015	河野健
Chap. 4	海水の密度	G204JP:001	内田裕
Chap. 5	透明度	G205JP:001-002	中野俊也
Vol. 3	**採水分析（溶存態）**		
Chap. 1	**溶存酸素**	**G301JP: 001-030**	**熊本雄一郎・高谷祐介・宮尾孝・佐藤弘康・松本慧太郎**
Chap. 2	**ガス分画連続流れ方式の分析装置を用いた高精度で相互比較可能な海水中の溶存栄養塩類（N, P, Si）分析方法**	**G302JP:001-017**	**青山道夫**
Chap. 3	**微量金属**	**G303JP:001-004**	**小畑元**
Chap. 4	**DIC**	**G304JP:001**	**石井雅男**
Chap. 5	**全アルカリ度（分光光度法）**	**G305JP:001-010**	**石井雅男・小杉如央**
Chap. 6	**pH**	**G306JP:001**	**石井雅男**
Chap. 7	**pCO_2**	**G307JP:001**	**石井雅男**
Chap. 8	**クロロフルオロカーボン類および六フッ化硫黄**	**G308JP:001-009**	**佐々木建一**
Chap. 9	**炭素同位体比（$\Delta^{14}C$、$\delta^{13}C$）**	**G309JP:001-018**	**熊本雄一郎・荒巻能史**

Chap. 10	**DOC/DON/DOP**	**G310JP:001-013**	**小川浩史**
Vol. 4	採水分析 II（粒子態）		
Chap. 1	粒子態有機炭素(POC)，粒子態窒素 (PN)，および粒子態リン (PP)	G401JP:001-006	芳村 毅
Chap. 2	生物ケイ酸	G402JP:001-004	橋濱史典
Chap. 3	粒子状有機物の炭素・窒素安定同位体比	G403JP:001-007	梅澤有
Chap. 4	植物色素	G404JP:001-005	鈴木光次
Chap. 5	細菌および従属栄養性微小鞭毛虫類		
Chapter 5-1	細菌および従属栄養性微小鞭毛虫類：蛍光顕微鏡による細菌の計数	G4051JP:001-006	横川太一
Chapter 5-2	細菌および従属栄養性微小鞭毛虫類：フローサイトメトリーによる細菌の計数	G4052JP:001-004	佐藤光秀
Chap. 6	微小動物プランクトンの定量	G406JP:001-006	太田尚志
Chap. 7	基礎生産	G407JP:001-003	鈴木光次
Chap. 8	濁度・SS	執筆中	太田秀和
Chap. 9	TP,TN、COD（規制項目として）	執筆中	太田秀和
Vol. 5	底質分析		
Chap. 1	海底堆積物採取	G501JP:001-003	成田 尚史
Chap. 2	含水率・空隙率	G502JP:001-006	成田 尚史
Chap. 3	焼却減量	G504JP:001-003	成田 尚史
Chap. 4	粒度組成	G505JP:001-011	成田 尚史
Chap. 5	主成分組成	執筆中	成田 尚史
Chap. 6	間隙水	執筆中	成田 尚史
Vol. 6	プランクトン・ベントス		
Chap. 1	プランクトンネット	G601JP:001-009	齊藤宏明
Chap. 2	底生生物（ベントス）	G602JP:001-006	小島茂明
Vol. 7	Underway		
Chap. 1	pCO_2	G701JP:001-007	笹野大輔・中岡慎一郎
Chap. 2	ADCP	G702JP:001-004	纐纈慎也
Chap. 3	水深	執筆中	内田裕・末吉惣一郎
Chap. 4	海上気象	G704JP:001-141	中野俊也
Chap. 5	海氷	G705JP:001-037	豊田威信
Chap. 6	光環境（物理、生物）	執筆中	虎谷充浩・小林拓
Vol. 8	センサー観測		
Chap. 1	TSG	執筆中	内田裕

Chap. 2	XBT／XCTD	G802JP:001-013	木津昭一
Chap. 3	電気伝導度水温水深計（外洋観測）	G803JP:001-011	内田裕
Chap. 4	沿岸域における CTD 観測	執筆中	太田秀和
Chap. 5	溶存酸素センサー（CTD 観測用）	G805JP:001-018	内田裕・高槻靖
Chap. 6	蛍光光度計	執筆中	内田裕
Chap. 7	透過度・濁度計	執筆中	内田裕・荒川久幸
Chap. 8	海洋中の光	G808JP:001-008	平譯亨・鈴木光次
Chap. 9	降下式超音波流速プロファイラ（LADCP）観測	G809JP:001-007	纐纈慎也
Vol. 9	天然および人工放射能		
Chap. 1	海水	執筆中	青山道夫
Chap. 2	海底堆積物	G902JP:001-008	乙坂 重嘉・成田 尚史
Chap. 3	大型生物	G903JP:001-004	森田貴巳
Chap. 4	プランクトン・ベントス	G904JP:001-004	帰山秀樹
Vol. 10	バックグラウンド汚染物質		
Chap. 1	重金属	執筆中	太田秀和
Chap. 2	石油・炭化水素	G1002JP:001-014	牧秀明
Chap. 3	マイクロプラスチック（表層水の曳網観測）	G1003JP:001-009	宮尾孝
Chap. 4	浮遊汚染物質（船からの目視観測）	G1004JP:001-008	宮尾孝
Chap. 5	残留性有機汚染物質	執筆中	山下信義
Chap. 6	新規残留性有機汚染物質（2009 年以降）	執筆中	山下信義

担当編集者一覧

This page left intentionally blank

溶存酸素

○熊本 雄一郎（海洋研究開発機構）、高谷 祐介（気象庁）、宮尾 孝（気象庁）、佐藤 弘康（マリン・ワーク・ジャパン）、松本 慧太郎（マリン・ワーク・ジャパン）

1、はじめに

この項では、海水中に溶けている酸素（酸素分子、O_2）の定量法について述べる。海洋表面水中の溶存酸素濃度は、大気海洋間の気体交換によって、大気中の酸素濃度と平衡する濃度に近づく。海洋表層の有光層では、植物プランクトンの光合成による酸素の生成が卓越し過飽和になることもある。一方、海水が表層を離れて無光層まで潜りこむと、有機物の分解により消費され溶存酸素濃度は減少するだけとなる。したがって海水中溶存酸素濃度は、大気海洋気体交換、海水混合、生物地球化学などの研究分野において最も基本的な測定項目のひとつとなっている。

海水中溶存酸素の分析の歴史は長く、容量分析法、ガス分析法、比色分析法などが報告されている（北野、1964）。それらのうちでもっとも古典的な方法のひとつが、容量分析法のヨウ素還元滴定法（iodometric titration）である。この滴定法は、最初の報告者の名を冠してウィンクラー法（Winkler, 1888）と呼ばれる。その後ウィンクラー法には改良が加えられ（Carpenter, 1965a）、高価な分析機器を使用することなく簡便かつ高感度な分析が可能であるため、海水中の溶存酸素濃度の標準的な分析法（Strickland and Parsons, 1972; Grasshoff, 1976; Culberson, 1991; JGOFS, 1994; Dickson, 1996; Hansen, 1999; Langdon, 2010）となってきた。また、その原理を利用した比色分析法も、多く報告されている（Broenkow and Cline, 1969; Pai et al., 1993; Labasque et al., 2004）。国内においても、気象庁の編集による「海洋観測指針」（気象庁、1999）に記載された改良ウィンクラー法（以後単にウィンクラー法という）が広く普及している。

ウィンクラー法は、滴定終点の判定に鋭敏なヨウ素デンプン反応（青紫色）を利用することで、分析感度を上げている。近年、比較的安価な自動滴定装置の普及に伴って、デンプンを用いずに遊離したヨウ素による黄色（350nm 付近）の吸光度を測定して、自動的に滴定終点を求める方法が一般的になりつつある（宮尾ら、2013）。上述の「海洋観測指針」（気象庁、1999）も、光学的自動滴定装置を用いた方法に改訂される予定である。

我々は過去約 10 年間、主に外洋域において自動滴定装置を用いたウィンクラー法によって溶存酸素濃度を測定してきた。その間、常に 0.1μmol·kg^{-1} 程度の高い繰り返し測定精度（標準偏差）が維持されている。自動滴定によって分析精度が向上した結果、これまであまり議論されてこなかったウィンクラー法の妨害物質や不確かさ（uncertainty）の評価方法の問題が顕在化してきた。改訂される「海洋観測指針」に倣い、本項においても自動滴定装置によるウィンクラー法について記述するが、あわせて主に外洋海域における妨害物質と、それに付随する測定の不確かさについても詳述した。本項が、高い分析精度の溶存酸素濃度データを求める海洋研究者、技術者の参考になることを願う。なお、従来のデンプンを用いる手分析法については、改訂前の「海洋観測指針」（気象庁、1999）を参照いただきたい。

ウィンクラー法では、溶存酸素を直接測定しているわけではなく、溶存酸素量と等価の遊

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

離ヨウ素をチオ硫酸ナトリウムでヨウ素イオンに還元滴定することで、間接的に溶存酸素量を求める。そのため、滴定条件下でこの酸化還元反応に寄与する物質、すなわち妨害物質も含めて「溶存酸素」として計測されてしまう。このうち、添加試薬に含まれる溶存酸素と妨害物質の寄与分は、事前に求められた値を用いて一律に補正される。一方、海水試料に含まれる妨害物質については、厳密には試料毎に測定されたその濃度を用いて、ウィンクラー法で測定された溶存酸素濃度を補正しなければならない。妨害物質濃度の測定方法については後述するが、以下では「溶存酸素と妨害物質の合計濃度」と記す煩雑さを避けるため、ウィンクラー法で測定される濃度を単に「溶存酸素濃度」と呼ぶ。

本項は以下、単位（2）と測定原理（3）の説明に続き、試薬調製（4）、必要な器具（5）、試料採取（6）、分析（7）、濃度計算（8）、測定の不確かさ（9）、トレーサビリティと妨害物質（10）、そして最後に付録（11）の順で構成されている。（4）～（9）は、試料採取・分析の準備から濃度・不確かさの計算方法までを概観できるように実際の作業順に沿って記載した。トレーサビリティと妨害物質（10）は、ウィンクラー法によって測定される「溶存酸素濃度」をより深く理解する一助になれば幸いである。記述がやや煩雑な、純水の密度計算（11-1）、海水の密度計算（11-2）、定容器具の容量校正（11-3）は最後に付録としてまとめた。そのなかで定容器具の容量校正（11-3）は、高い分析精度を得るために必要不可欠であるので是非一読いただきたい。なお、（4）～（8）と（11）の多くの部分が、改訂される「海洋観測指針」の記述と重複していることをお断りしておく。

2、単位

溶存酸素濃度は、海水 1 リットル中に溶けている酸素の標準状態（0℃、1 気圧＝101325Pa）における容量[mL·L^{-1}] 、もしくは重さ[mg·L^{-1}]の単位で表されることが多かった。しかし、1997 年に標準状態の気圧が変更されたこと（IUPAC, 1997）などから、より厳密な物質量であるモルを用いる容量モル濃度[μmol·L^{-1}]の使用が推奨されている。最近では水温の変化の影響を受けない重量モル濃度[μmol·kg^{-1}]を用いているマニュアルも多い。本項では、最終的に報告する濃度として重量モル濃度[μmol·kg^{-1}]を使用する。容量モル濃度を重量モル濃度に換算するために必要な海水密度の計算は、11-2 を参照されたい。過去に報告されている[mL·L^{-1}] や[mg·L^{-1}]単位の溶存酸素濃度を[μmol·L^{-1}]単位に換算する式は以下の通りである。

$$[\mu\mathrm{mol}\cdot\mathrm{L}^{-1}] = [\mathrm{mL}\cdot\mathrm{L}^{-1}]\cdot\frac{1000}{22.392} = [\mathrm{mg}\cdot\mathrm{L}^{-1}]\cdot\frac{1000}{(15.9994\times 2)}\ . \qquad (1)$$

ここで、22.392 は標準状態（0℃、101325Pa）における酸素 1 モルの体積[L·mol^{-1}]。15.9994 は酸素 1 モルの原子量[g·mol^{-1}]である。

3、測定原理

海水試料に塩化マンガン溶液を加え、さらにヨウ化カリウム／水酸化ナトリウム混合溶液を加える。すると、強アルカリ性の条件下でコロイド状の水酸化マンガンの白色沈殿が形成される。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

$$Mn^{2+} + 2OH^- \rightarrow Mn(OH)_2 \downarrow . \quad (2)$$

この沈殿の一部は、試料中の溶存酸素で酸化されて褐色に変わる（これを溶存酸素の「固定」という）。

$$2Mn(OH)_2 + O_2 \rightarrow 2MnO(OH)_2 \downarrow , \quad (3)$$
$$4Mn(OH)_2 + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4Mn(OH)_3 \downarrow . \quad (4)$$

ここに酸を加えて酸性条件にすると沈殿は溶解し、マンガンが還元されてヨウ素が遊離する。

$$2MnO(OH)_2 + 4I^- + 8H^+ \rightarrow 2Mn^{2+} + 2I_2 + 6H_2O , \quad (5)$$
$$4Mn(OH)_3 + 4I^- + 12H^+ \rightarrow 4Mn^{2+} + 2I_2 + 12H_2O . \quad (6)$$

いずれの反応経路をたどっても、試料中の溶存酸素 1 モルにつき遊離するヨウ素は 2 モルである。この遊離ヨウ素は過剰に存在するヨウ素イオンと反応して三ヨウ化物イオンとなり、既知濃度のチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定される。

$$I_2 + I^- \rightarrow I_3^- , \quad (7)$$
$$I_3^- + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow 3I^- + S_4O_6^{2-} . \quad (8)$$

この滴定では、遊離ヨウ素 1 モルにつき 2 モルのチオ硫酸イオンを要する。したがって固定された溶存酸素 1 モルは、チオ硫酸ナトリウム 4 モルに相当する。この関係から溶存酸素量を間接的に求めることができる。

4、試薬調製

試薬はすべて特級以上のグレードのものを用いる。試薬ロットにより管理し、入荷、使用開始の年月日等も記録しておく。試薬溶液の調製に際しても、作業年月日、作業者、使用した容量器具、使用した試薬のロットと使用量等を記録しておく。これらの情報は、測定結果に疑問が生じたとき、原因を追究するための重要な手懸かりになる。試薬溶液の調製にあたっては、強酸、強アルカリをはじめ、劇物や危険物にあたる薬品を扱うことになるので、適切な実験設備のある場所で、必要に応じて手袋、保護メガネ等を装着し、複数名で作業することが望ましい。

4-1、塩化マンガン溶液（3M）：固定試薬「I 液」

ビーカーに 700mL 程度の純水（deionized water、以下 DIW という）を入れ、約 600g の塩化マンガン四水和物（分子量 197.90）をゆっくりと加え、マグネットスターラを使用して完全に溶解させた後に、DIW を加えて全体量を 1L とする。溶液中に固形物が認められる場合

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

には、グラスファイバー濾紙で濾過する。溶液は遮光できる容器に貯えておく。

4-2、ヨウ化ナトリウム（4M）・水酸化ナトリウム（8M）混合溶液：固定試薬「Ⅱ液」

ビーカーを用いて約 600mL の DIW に、約 320g の水酸化ナトリウム（分子量 39.997）を溶解させる。この際激しく発熱するので、水槽などを利用してビーカーを冷やしながら行う。その溶液にさらに、ヨウ化ナトリウム（分子量 149.89）を約 600g 溶かし、周囲の温度になじませた後に、DIW を加えて全体量を 1L とする。固形物が残ることがあるが、試薬ブランクに影響する還元剤となるので、グラスファイバー濾紙で濾過して除去する。調製した溶液は、樹脂製栓付の遮光できる容器に貯えておく。ガラス製の栓は、強アルカリのために固着してしまうので、使用してはならない。ヨウ化ナトリウムは潮解しやすく、空気で酸化されたり光にさらされたりするとヨウ素を遊離して劣化する。本来は白色であり、黄色がかっているものは劣化しているので使用するべきではない。

4-3、希硫酸溶液（5M）

ビーカーに約 600mL の DIW を入れておき、濃硫酸（分子量 98.079、密度 1.84g·mL^{-1}） 約 280mL を少しずつ、静かに撹拌しながらゆっくりと注ぎ入れる。この時、必ず DIW 中に硫酸を少しずつ入れること。逆に硫酸に DIW を入れると、突沸して飛散する恐れがある。この作業は沸騰するほどの発熱を伴うので、水槽などを利用してビーカーを冷やしながら行う。周囲の温度になじませた後、DIW を加えて全体量を 1L とする。

4-4、チオ硫酸ナトリウム滴定液（0.04M）

チオ硫酸ナトリウム五水和物（分子量 248.19）約 10g を 1L の DIW に溶かせば、およそ 0.04M（= mol·L^{-1}）の溶液を得る。チオ硫酸ナトリウムは溶液中の酸素や二酸化炭素との反応、バクテリアの活動などによって分解され、その濃度が低下する。そのため、炭酸ナトリウム（Strickland and Parsons, 1972）、またはホウ酸ナトリウム（JGOFS, 1994）を安定剤として加えることもある。また煮沸処理した DIW を用いて調製すると、濃度変化が起きないとする報告もある（田中ら, 2007）。安定剤を加えない場合でも、経験的に調製後一昼夜以上（2～5 日ともいわれる）放置すれば安定性が増すことがわかっている（Langdon, 2010）。これは、調製直後にある程度分解が進めば、その後は分解される量が減るためと解釈されている。なお、この滴定液はしばしば「ハイポ」と呼ばれるが、これは「チオ硫酸ナトリウム＝次亜硫酸ナトリウム（sodium hyposulfite）」という誤称に由来する。

チオ硫酸ナトリウム溶液の濃度は、対象とする海水試料に含まれる溶存酸素量とその滴定に使用するマイクロシリンジ（ビュレット）の容量（5-2-1）によって決められる。溶存酸素濃度が 400 µmol·L^{-1} と高濃度な海水試料（例えば北極海の表面水）100mL に含まれている溶存酸素（40 µmol）を滴定するためには、容量モル濃度 0.04mol·L^{-1} のチオ硫酸ナトリウム溶液 4ml が必要である。もし滴定用マイクロシリンジの容量が 4ml よりも小さいならば、滴定液の濃度を高めて滴定量を減らさなければならない。10mL 程度のマイクロシリンジを使用する場合、チオ硫酸ナトリウム溶液濃度を半減して滴定量を倍増させることで、滴定の解像度を

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

2 倍に向上させることができる。

4-5、ヨウ素酸カリウム標準液(1/600 M)

ウィンクラー法における標準溶液は、ヨウ素酸カリウム（分子量 214.001、密度 3.89g·cm^{-3}) の濃度既知溶液である。ヨウ素酸イオンは酸性状態で、ヨウ素イオンをヨウ素に酸化する。

$$IO_3^- + 5I^- + 6H^+ \rightarrow 3H_2O + 3I_2 \ . \qquad (9)$$

ヨウ素は過剰に存在するヨウ素イオンと反応して三ヨウ化物イオンとなり、チオ硫酸ナトリウム溶液で還元される（3）。この反応では、1 モルのヨウ素酸イオンが 6 モルのチオ硫酸イオンに相当する。三ヨウ化物イオンの滴定に必要とされたチオ硫酸ナトリウム溶液の量とヨウ素酸カリウム溶液の濃度から、チオ硫酸ナトリウム溶液の濃度を決定する。これをチオ硫酸ナトリウム溶液の標定という（7-2）。ヨウ素酸カリウムは高純度のものが市販されているが、国際 SI 単位系にトレーサブルである認証標準物質を用いるべきである。国内では、計量標準総合センターから「NMIJ CRM 3006-a」が供給されている（計量標準総合センター、2015）。重量法によるヨウ素酸カリウム標準溶液の調製手順は以下のとおりである（溶液濃度の計算方法は 8-1 に記す）。なお、濃度 0.0100N （1 モルのヨウ素酸イオンは 6 モルのチオ硫酸イオンと反応するため、1⁄100N は 1⁄600M に相当する）のヨウ素酸カリウム標準溶液が和光純薬（株）から市販されているが（Cooperative Study of Kuroshio Standard Solution、販売コード 034-10251）、1%以下の分析精度を求める時には標準溶液としては使用できない。

4-5-1、電子天秤の準備

最大秤量 200g 程度で 0.01mg まで測定できる精密天秤を、ヨウ素酸カリウムの秤量用に準備する。この精密天秤は、静電気による妨害を排除するための静電気除去装置や電導性ガラス風防を備えたものが推奨される。また、溶液秤量用に最大秤量 10kg 程度で 10mg まで測定できる上皿天秤も準備する。

4-5-2、ヨウ素酸カリウムの乾燥

高純度のヨウ素酸カリウム約 0.5 g を乳鉢で軽く押しつぶす程度に粉砕して秤量瓶に取り、これを 130℃で 2 時間程度乾燥させた後、デシケータ（シリカゲル使用）中で放冷する。

4-5-3、ヨウ素酸カリウムの秤量

ヨウ素酸カリウム約 0.36g を秤量瓶に量り取ってふたをし、精密天秤で重量を測定する。

4-5-4、ヨウ素酸カリウムの添加

1L メスフラスコを上皿天秤上に置き、その風袋重量を測定する。秤量瓶のふたを開け、粉末漏斗を用いてヨウ素酸カリウムを、メスフラスコに移す。粉末漏斗に付着したヨウ素酸カリウムはすべて DIW で流し込むが、秤量瓶には DIW を付けてはならない。秤量瓶にふたをして精密天秤で重量を測定し、前後の重量差からメスフラスコに移したヨウ素酸カリウム量（w_{KIO_3} [g]）を求める。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

4-5-5、DIW の添加と重量測定

メスフラスコに DIW を加え、ヨウ素酸カリウムを溶解させる。1L にメスアップし、ヨウ素酸カリウムと DIW の重量の和（$w_{dw} + w_{KIO_3}$[kg]）を記録する。この時、濃度は重量で計算されるため、正確にメスアップする必要はない。

4-5-6、撹拌溶解

メスフラスコに栓をして転倒混和した後に、マグネティックスターラーを用いて 1 時間以上撹拌し、ヨウ素酸カリウムを完全に溶解させる。

4-5-7、調整溶液の保管

調製した標準溶液は、褐色ガラス瓶（250mL または 500mL 容器）に小分けする。この小分けにした溶液は、1 回の標定作業毎にすべて使い切る（1 度開封したものを再利用しない）。ヨウ素酸カリウム溶液は、化学的に安定である。しかし調製後すぐに使用しないで保存する場合には、ガラス瓶とスクリューキャップ式フタのわずかな隙間から水分が徐々に蒸発する（濃度が上昇する）ことを防ぐために、ガラス瓶を気密性の高いビニル袋に入れて保管する（家庭用真空パック器などを利用してもよい）。例えば 5L のメスフラスコを使ってまとめて調製された溶液も適切に保管すれば、数年間継続して使用することが可能である。

5、必要な器具

5-1、試料採取用の器具

5-1-1、酸素瓶

内容量約 100mL の、カラー（襟）付の酸素瓶（フラン瓶）を使用する。酸素瓶は海水試料を採取して溶存酸素を固定するための容器であると同時に、滴定に際にはフラスコの役目も果たす。カラーは、採水時には大気中酸素からの汚染を防ぎ、保管時にはカラー部に水を張ることで同じく大気の混入を防ぐために有用である。また、栓は長めのものを選ぶ。これは、滴定時に滴定溶液を加えるための空間を瓶内部に確保するためである。酸素瓶の内容量は、事前に容量検定しておく（11-3）。容量が測定済の瓶も市販されているが、確認のため容量検定は必要である。瓶の内壁や栓に傷や欠けを生じると、内容量が変わって誤差要因となるので注意深く取り扱う。酸素瓶の本体と栓には必ず番号を付して、取り違えないように決まった組み合わせで管理する。酸素瓶と栓はすり合わせになっているため、乾瓶では栓が取り外しにくくなることがある（栓が取り外し易いように、すり合わせ部分に溝が掘ってある瓶もある）。これを避けるために栓をしない状態で瓶を保管してもよいが、瓶内部が汚れないように留意しなければならない。使用を重ねると、栓と瓶首のすり合わせ部分に汚れが付着する。その場合には塩化ヒドロキシルアンモニウム溶液（約 200g·L^{-1}）にしばらく漬け置き、洗浄する。

5-1-2、採水チューブ

チューブの内壁に気泡が付いていないか確認できるよう、タイゴン、シリコン等の透明な材質の樹脂製チューブを用いる。新しいチューブは、予め DIW またはきれいな海水に浸して

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

おくことで気泡が付きにくくなる（Dickson, 1996）。2 本指で軽く押さえて止水できる程度の堅さのチューブを用いると、効率的に採水作業ができる。採水器のペットコック（採水口）、あるいは採水バケツの底から酸素瓶の底まで十分にとどく長さのものを用意する。

5-1-3、固定試薬用分注器

固定試薬Ⅰ液（4-1）およびⅡ液（4-2）をそれぞれ 1mL づつ分注するために、プランジャー（棒ピストン）式の分注器を２つ用意する。光による変質を避けるため、褐色の試薬保存瓶を使用する。角柱型（1L）の試薬瓶は取り扱いに便利である。また、Ⅱ液の分注器を長期間放置すると、プランジャーが固まってしまうことがある。その場合は酸素瓶と同様に、塩化ヒドロキシルアンモニウム溶液（約 200g·L^{-1}）に漬け置き洗浄する（汚れがひどい時は分解して洗浄する）。固定試薬Ⅰ液とⅡ液の合計容量（2mL）は、溶存酸素濃度の計算に直接反映される（8-3-3）。そのため、分注量の繰り返し精度の高い分注器を選び 25.5℃における容量検定を行い、分注される固定試薬溶液の容量（V_{reg}[mL]）を求めておく（11-3）。25.5℃は、固定試薬溶液中の溶存酸素の飽和濃度が求められている温度である（6-1）。

5-1-4、水温計

酸素瓶に採取した時の海水試料の温度を測定するため、瓶底に届くのに必要な長さの棒状温度センサーが付いた電池式デジタル水温計を用意する。有効桁数は 3 桁（0.1℃まで）で十分であるが、校正済み水銀棒状温度計と比較することで事前に校正しておく必要がある。具体的には、恒温槽を用いて試料温度範囲（0～30℃）の数点の温度点にて、デジタル水温計の表示値と水銀棒状温度計の読取値から回帰式を求める。

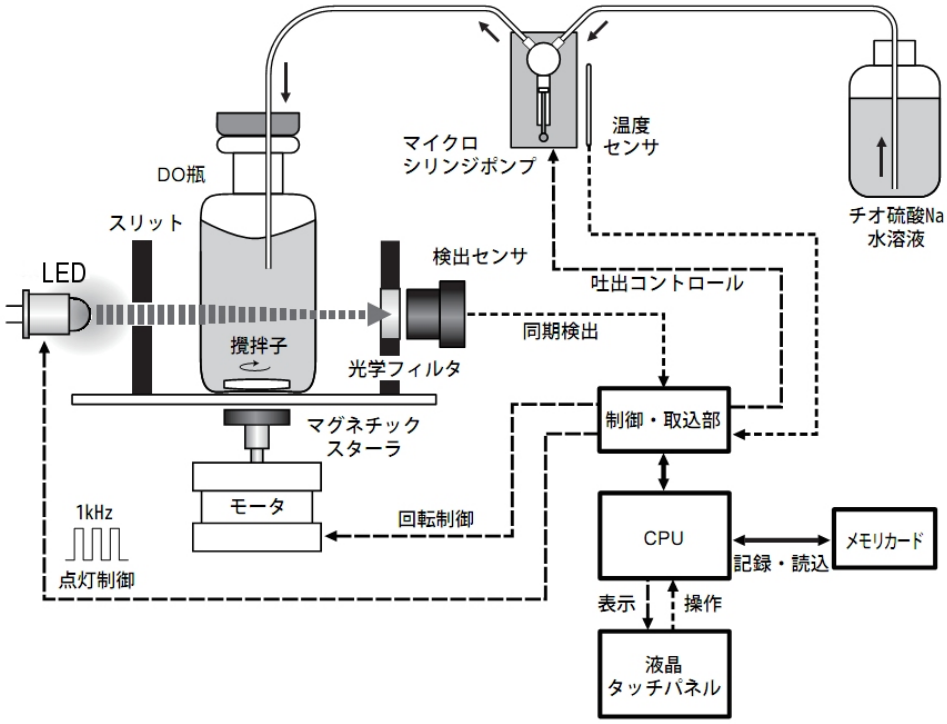

図 1　自動酸素滴定装置の概念図（紀本電子工業株式会社（2009）の図を修正）。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

5-2、滴定用の器具

5-2-1、自動酸素滴定装置

光学的に滴定終点を検出する自動滴定装置の全体構成の概念を、図 1 に示す。この装置は、数 mL の滴定液を 1μL づつ吐出できる自動マイクロシリンジ（ビュレット）を備えている。マイクロシリンジの容量は、5～10mL のものが一般的である。マイクロシリンジの容量は、使用する滴定量範囲で校正しなければならない。そのため、滴定量範囲の 5～6 点で容量検定を行い、表示される滴定量から実滴定量を計算する式を求めておく（11-3）。滴定は、波長 350～400nm 付近における吸光度をモニターしつつ、滴定速度とマグネティックスターラーの撹拌速度を自動制御し、最適化された滴定曲線から滴定終点を求めることで自動的に実行される（滴定終点の計算方法はマニュアルで確認しておくこと）。そのため、測定結果に分析担当者の技量などによる個人差が生じにくい。なお、光学的滴定の代わりに電流滴定を用いた自動測定も報告されているが、滴定原理以外に測定方法に違いは無く、２つの方法で得られた分析結果に有意な差は確認されていない（Culberson et al., 1991; Langdon, 2010）。

5-2-2、撹拌子（スターラーチップ）

表面にフッ素樹脂（PTFE）コーティングが施された、長さ 25～30mm の棒状磁石を使用する。撹拌子は一試料を処理するごとに一個必要である。あらかじめ洗浄して乾燥したものを使用するので、一連の滴定作業で処理する試料数を考慮して多めに用意する。特定の酸素瓶で撹拌子が滑らかに回転しない場合、酸素瓶底の形状に問題（凹凸など）がある可能性が高いので、そのような瓶は使用を控える。

5-2-3、希硫酸用分注器

5M 希硫酸を 1mL 分注するための分注器を用意する。固定試薬の分注の場合とは異なり、この希硫酸の分注量は直接溶存酸素濃度の計算には影響しないため、高い精度は必要ではない（手動ピペット等でも可）。しかし、固定試薬と希硫酸の分注量は滴定時の試料 pH が 2 になるように決められているので、それらの濃度と量は 5%以上誤差があってはならないとされている（Carpenter, 1965a）。

5-2-4、ヨウ素酸カリウム標準溶液用分注器

ヨウ素酸カリウム標準溶液 1～10mL を正確に分注するため、分注精度の高い電動式のガラス製マイクロシリンジ（ビュレット）またはピペットを用いる。事前に、目的の分注量（例えば試薬ブランクの測定用(7-3)に 1mL と、チオ硫酸ナトリウム溶液の標定用(7-2)に 10mL）の容量を検定しておく（11-3）。

5-2-5、水温計

海水試料採取用の水温計（5-1-4）と同じ仕様のものを、ヨウ素酸カリウム標準溶液の液温を測定するために用意する。試料採取用の水温計と同じく、この標準溶液用の水温計も校正済み水銀棒状温度計によって検定されなければならない（試料採取用と標準溶液用の水温計は併用しても良い）。またそれらとは別に、チオ硫酸ナトリウム溶液を連続して測温するための水温計を準備する。自動滴定装置に滴定液を測温するための水温計が付属している場合

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

には、それを利用してもよい。チオ硫酸ナトリウム溶液の液温は変化しなければ原理的には分析結果に影響を与えることはないので、この水温計を校正済み水銀棒状温度計を用いて検定する必要は無い。

5-2-6、洗浄瓶

250mL または 500mL の DIW 用洗浄瓶を適宜用意する。また、酸素瓶底の沈殿を乱さないようにカラーに張られた DIW を吸い取る際に（7-1-2）、空の洗瓶を使うと便利である。

6、試料採取

採水器やバケツなど採取された海水試料は、外気に触れたり水温が変わらないうちにできるだけ早く酸素瓶に分取されなければならない。他成分を分析するための海水試料もいっしょに分取する場合、溶存酸素を含むガス成分の分取を優先させる。また、採水深度の異なる複数の採水器から同時に分取する場合、水温変化をなるべく小さくするために深い層で採水した海水から順番に分取する。採水器から海水試料を酸素瓶に分取する手順は以下のとおりである。なお、採水バケツから分取する場合は、長めの採水チューブを用意し、サイフォンを利用して下記の手順に準じて分取する（酸素瓶を直接バケツに漬けて海水を汲み取らないこと）。

6-1、採水準備

採水現場には、酸素瓶と栓のセットのほか、清水の入ったバケツ、固定試薬溶液（Ⅰ液とⅡ液）の入った分注器、水温計および測温記録シートを用意しておく。固定試薬の入った容器には断熱材を巻き、また直射日光を避けるなどして固定試薬溶液の液温を 25.5℃に近い温度に保つ（冷蔵庫等で保存しないこと）。これは、溶存酸素濃度の計算時（8-3-1）に補正される固定試薬溶液に含まれる溶存酸素量が、25.5℃におけるその飽和量と仮定されているためである（Murray et al., 1968）。

6-2、酸素瓶の確認

酸素瓶はあらかじめ内部を乾燥させたものを用いる。誤って分取前に瓶を濡らしてしまった場合は、可能な限り乾燥した別の酸素瓶を使用して採水をやり直す（Dickson, 1996）。内壁が濡れたビンの場合を使う場合は、試料のオーバーフローの量を増やす（瓶容量の 3 倍）と良いとする報告もある（Horibe et al., 1972）。

6-3、採水チューブの取り付け

採水チューブを採水器のペットコック（採水口）に取り付ける。ペットコックを押し込み、採水器上部のエアベント（空気抜き）を緩めて海水を出す。チューブを軽くたたいたり揉んだりしながら、水流でチューブ内部の気泡を完全に追い出す。

6-4、酸素瓶への導水

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

採水チューブの途中を指でつまんで水流を止め、チューブ先端を酸素瓶の底近くまで入れてから指を徐々に緩める。チューブ先端は常に瓶底とし、気泡を入れたり試水をかき混ぜたりしないよう水面を静かな状態に保ちながら、ゆっくり水流を酸素瓶に導く。

6-5、オーバーフロー

酸素瓶が満水となったらチューブから指を離し、海水を流し続けて酸素瓶容量の 2 倍程度オーバーフローさせる（あらかじめ満水になるまでの時間を計測しておくと、経過時間でオーバーフローの量を推定できる）。酸素瓶の内部に気泡がないことを確認して、試水をオーバーフローさせながら静かにチューブを引き上げる。チューブを水面から抜き去る直前に、チューブを指でつまんで水流を完全に止める。分取作業中に、採水の架台や採水器からしたたり落ちる水滴等が混入しないよう注意する。

6-6、止水

ペットコックを手前に引いて水流を止める。手から余分な熱を与えないよう、酸素瓶の口近くを持って、固定試薬のある場所に直ちに移動する（もしくは固定担当者に酸素瓶を渡す）。

6-7、固定試薬溶液の添加

固定試薬をⅠ液、Ⅱ液の順に分注器で 1mL ずつ静かに注入する。分注器のノズル先端は酸素瓶の首（カラーと本体の間のくびれた部分）よりも下まで差し込む。固定試薬はいずれも海水よりも密度が大きいので、酸素瓶の底へと沈んで沈殿を作り、合計 2mL の試水を酸素瓶から押し出すことになる。なお、固定試薬の分注器は事前に試し打ちをしてノズルから気泡を除去しておく。また、ノズルに水滴などが付着していたら、ワイプ紙等を軽く当てて取り除く。

6-8、測温と施栓

すぐに水温計で試料の水温（t_s[℃]）を測定し、測温シートに瓶番号とともに記録する。その後直ちに酸素瓶の口に栓を静かに沈める。きれいな乾いた栓は、試料海水で共洗いする必要はない。瓶を転倒させて内部に気泡が入っていないことを確かめる。気泡が入っている場合は、別の酸素瓶を用意して採水をやり直す。海水試料水温によって変化する酸素瓶容量、海水試料密度を正確に見積もるためには、栓をする直前に水温測定することが理想的である。一方、大気中酸素の海水試料への侵入を抑えるためには、試料分取から栓の挿入までの時間をできるだけ短くしなければならない。溶存酸素濃度が約 100 μmol·kg^{-1} の海水試料について、試料分取後直ちに「固定」した場合と、2 分後に「固定」した場合の測定結果を比較したところ、後者は前者に比べて約 0.3 μmol·kg^{-1}（約 0.3%）有意に高くなったというデータがある。したがって、溶存酸素濃度の低い試料の場合には、試料水温は試料を分取（オーバーフロー）している間（6-5）に測定し、固定液添加後は直ちに栓をすることが推奨される。

6-9、撹拌混合

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

栓を指でしっかり押さえ、酸素瓶をバケツの清水にくぐらせた後、瓶を回転させ内部の沈殿をかき混ぜるように 20 回程度勢いよく振り、沈殿を瓶の全体にゆきわたらせる。この時の混合が不十分だと、水酸化マンガンと溶存酸素の反応が完了しない。

6-10、保管

酸素瓶のカラーの部分に洗浄瓶で DIW を張り、酸素瓶中試料と大気を遮断する。DIW と瓶内部の海水には密度差があるため、瓶と栓の間のわずかな隙間を通じた、DIW 中溶存酸素の瓶内への侵入は抑制される。DIW が無い場合、隙間から侵入した大気中酸素は瓶内の試料海水中に拡散すると考えられる。すべての採水が終了した後、試料の入った酸素瓶は室温が安定している暗所で静置する。

6-11、再撹拌混合

30 分ほど経過して沈殿が瓶の半分よりも下に落ち着いたら、酸素瓶内部の溶存酸素を固定試薬と完全に反応させるため、固定直後と同様に酸素瓶を振って沈殿を再び瓶の全体にゆきわたらせる（二度振り）。その後、再び酸素瓶のカラーに洗浄瓶で DIW を張り、沈殿が栓の下端より下に落ち着くまで暗所で静置しておく。溶存酸素濃度約 200 $\mu mol \cdot kg^{-1}$ 以下の海水試料を用いた我々の実験では、この「二度振り」の有無による測定結果の有意な差は検出されなかった。しかし、海水試料を分取した者の技量による差を解消するために「二度振り」は有効であると考えられる。一方で、試料滴定の直前に誤って酸素瓶を転倒させてしまい沈殿が巻き上がってしまった結果、その試料中の溶存酸素濃度が約 1%高くなったという報告がある。これは、ほぼ無酸素状態の瓶内上澄み海水によって隔離されていた水酸化マンガン沈殿が、酸素瓶と栓の間を徐々に浸透してきた DIW 中の溶存酸素と反応したためではないかと推察される。したがって、「固定」から数時間以上経過した試料を「二度振り」してはならない。

7、分析（滴定）

測定原理（3）で示したように、溶存酸素を取り込んだ水酸化マンガン沈殿は酸性化で溶解し、溶存酸素量に相当する量のヨウ素が遊離する。ヨウ素は過剰ヨウ素イオンと反応し三ヨウ化物イオンとなり、チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定される。したがって試料中の溶存酸素濃度の計算するためには、滴定溶液であるチオ硫酸ナトリウム溶液の濃度を事前に求めておかなければならない。これを標定と呼ぶ。また、固定試薬と希硫酸溶液に含まれる微量の不純物には酸化あるいは還元作用を持つものがあり、チオ硫酸ナトリウム溶液による滴定値に影響を与える。これを試薬ブランクと呼び、チオ硫酸ナトリウム溶液の標定と同じく試料の測定に先だって求めておく必要がある。ここでは、前節の試料採取（6）を受けて試料の測定（7-1）、標定（7-2）、試薬ブランクの測定（7-3）の順に記述する。

7-1、試料の測定

酸素固定の反応が完了し、酸素瓶のカラーに DIW が張られていればそのまま数日保存し

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

ても滴定値に影響はないとされる（Langdon, 2010）。我々が実施した検討実験では、72 時間まではその分析濃度に有意な変化が見られないことが確認されている。通常は沈殿が瓶底で安定する概ね 1 時間から数時間後に滴定を始める。試料とチオ硫酸ナトリウム溶液が室温になじんでいることを確認して、測定を開始する（室温を記録する）。

7-1-1、自動酸素滴定装置の準備

自動酸素滴定装置にチオ硫酸ナトリウム溶液をセットし、手動でマイクロシリンジ（ビュレット）を動かし流路に溶液を導入する。この時、マイクロシリンジ、溶液流路に気泡が残らないようにする。水温計（5-2-5）をチオ硫酸ナトリウム溶液に漬けて、液温を測定し記録する（連続的に測定することが推奨される）。コンピュータで測定を制御している場合、必要に応じてサンプル ID などを入力する。5M 希硫酸を用意する。

7-1-2、瓶カラー部 DIW の除去

酸素瓶のカラーに張られた DIW を、瓶内の沈殿をかき乱さないように空洗瓶などで吸い取る。

7-1-3、希硫酸添加

酸素瓶から栓を引き抜き、栓を洗うように 5M 希硫酸 1mL を酸素瓶の中に流し込む。DIW の洗瓶を使って、栓と瓶の口周りの希硫酸を瓶内に流し込む。

7-1-4、撹拌子添加

海水試料が飛び散らないように撹拌子を酸素瓶に入れ、瓶の外側面をキムワイプ等できれいに拭いてから自動酸素滴定装置にセットする。

7-1-5、滴定

マグネティックスターラーを起動し、回転数が安定して（7rps 程度）沈殿がすべて溶解したことを確認してから自動滴定を開始する。撹拌子の回転が速すぎると気泡が発生しやすくなり、海水試料に溶け込んだ大気中酸素によってヨウ素イオンがヨウ素に酸化されるため誤差の要因になる。ただしこの化学反応の速度は遅いため、滴定に要する時間が 10 分以内であれば測定結果にほとんど影響を与えないと言われている。

7-1-6、滴定終了確認

滴定は自動的に終了するので、得られた滴定曲線、滴定終点（滴定値 V_{tit} [mL]）が記録されていることを確認する。滴定曲線に異常（ノイズなど）が見られる場合、滴定終点が適正に求められているかを確認しなければならない。

7-2、チオ硫酸ナトリウム（滴定液）の標定

標定は少なくとも一連の試料測定の直前と直後の 2 回実施し、試料測定中に滴定溶液の濃度が変化していないことを確認しなければならない。また測定の途中で滴定溶液を交換した時には、標定をやり直す。標定は、滴定溶液を室温になじませてから開始する（室温を記録する）。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

7-2-1、自動酸素滴定装置の準備

7-1-1 と同様に、自動酸素滴定装置を準備する。固定試薬Ⅰ液、Ⅱ液および 5M 希硫酸を用意する。

7-2-2、瓶の準備

酸素瓶に DIW を 3 分の 2 程度注ぎ、撹拌子を入れる。

7-2-3、ヨウ素酸カリウム標準溶液の添加

ヨウ素酸カリウム標準溶液（4-5）を、容量検定済の分注器（5-2-4）を用いて酸素瓶に 10mL 注入する。その後すぐに、水温計（5-2-5）を用いて褐色ガラス瓶に残った標準溶液の液温（t_L[℃]）を測定して記録する。

7-2-4、希硫酸添加

希硫酸 1mL を加えてマグネティックスターラー上で泡立たない程度に軽く撹拌する。

7-2-5、固定試薬 II 添加

続いてⅡ液 1mL を加え 10 秒くらい撹拌する。ヨウ素が遊離して濃い黄色を呈する。

7-2-6、固定試薬 I 添加

さらにⅠ液 1mL を加えて撹拌する。その後、瓶の首周辺に付着したⅠ液、Ⅱ液等を DIW で洗い流しながら、液量を瓶の肩口付近までとする。誤ってⅠ液、II 液の順で添加すると、局所的に水酸化マンガン沈殿が形成され誤差の原因となることがあるので注意すること。

7-2-7、滴定

酸素瓶の側面をきれいに拭き、自動酸素滴定装置にセットして滴定を開始する。滴定が終了したら、滴定曲線と滴定終点が記録されていることを確認する。

7-2-8、標定値の計算

上述の標定作業を複数回（3～5 回）繰り返し、各滴定終点の平均を標定値（V_{std}[mL]）とする。ヨウ素酸カリウム標準溶液の濃度が 1/600 mol·L^{-1}、チオ硫酸ナトリウムの濃度が 0.04 mol·L^{-1} の場合、チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量は 2.5mL となる。標定値からチオ硫酸ナトリウム溶液の濃度を計算する方法は、8-2 に記す。

7-3、試薬ブランクの測定

試薬ブランクの測定は、標定と同じく少なくとも一連の試料測定の直前と直後の 2 回実施し、試料測定中にその値が変化していないことを確認しなければならない。また測定の途中で固定試薬溶液、5M 硫酸溶液を交換した時には、試薬ブランクの測定をやり直す。試薬ブランクの測定は、滴定溶液を室温になじませてから開始する（室温を記録する）。なお、固定試薬中の溶存酸素はこの試薬ブランクには含まれないので、別途補正される（8-3-1）。

7-3-1、測定方法

試薬ブランクは、添加された試薬溶液中妨害物質の滴定に必要なチオ硫酸ナトリウムの容

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

量で表される。ヨウ素酸カリウム溶液の一定量をチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定した時に得られる滴定終点を V_1[mL]、その 2 倍量を同じチオ硫酸ナトリウム溶液によって滴定し得られる終点を V_2[mL]、ヨウ素酸カリウム溶液の一定量の滴定に必要なチオ硫酸ナトリウム溶液量を V_p[mL]とすると、試薬ブランク V_{blk}[mL]は以下のように求められる。

$$V_1 = V_P + V_{blk}\ , \tag{10}$$

$$V_2 = 2 \cdot V_P + V_{blk}\ , \tag{11}$$

$$V_{blk} = 2 \cdot V_1 - V_2\ . \tag{12}$$

具体的な操作としては、1 本の酸素瓶に 2 回に分けてヨウ素酸カリウム溶液の等量づつを注入しそれぞれ順次滴定する方法と、一定量とその 2 倍量のヨウ素酸カリウム溶液を注入した酸素瓶をそれぞれ別々に滴定する方法がある。前者は、必要とする瓶が 1 本で済むという利点があるが、1 回目の滴定では滴定終点の他に全滴定量（滴定終点を求めるために使用したチオ硫酸ナトリウム溶液の全量）も記録しなければならい。本項では、自動酸素滴定装置の仕様に依存しない後者の方法を記述する。

厳密には、ここで得られる試薬ブランクは試薬に含まれる妨害物質だけでなく、なんらかの原因による滴定終点と真の当量点の差にも依存する（Carpenter, 1965b）。このことは、同一試薬を用いた「試薬ブランク」の相互比較実験の結果に有意な差が見られることからも推察される（Culberson et al., 1991）。しかし、後者は各滴定装置に固有の「器差」とみなすことができ、その時間変動は小さいと考えられる。したがってここで得られる「試薬ブランク」を試薬に含まれる妨害物質にのみに依存すると見なしても、溶存酸素濃度の計算に影響はない。添加する試薬量を 2 倍、3 倍と増やして一連の試薬ブランクの測定操作を行い、得られた試薬ブランクと添加した試薬量の間の回帰式から、試薬ブランクのうち「器差」に依存するもの（＝回帰式の切片）と妨害物質に依存するもの（＝回帰式の傾き）を個別に見積もることも可能である。

7-3-2、自動酸素滴定装置の準備

7-2-1 と同様に、自動酸素滴定装置を準備する。

7-3-3、瓶の準備

酸素瓶 2 本にそれぞれ DIW を 3 分の 2 程度注ぎ、撹拌子を入れる。

7-3-4、ヨウ素酸カリウム標準溶液の添加

容量検定済の分注器を用いて 2 本の酸素瓶にヨウ素酸カリウム標準溶液 1mL と 2mL を、それぞれ注入する。この時、「2mL」の分注量は正確に「1mL」の 2 倍量になっていることが求められるため、「1mL」の分注を 2 回繰り返す。なお、ここで 1mL（とその倍量 2mL）は任意の量である。

7-3-5、希硫酸添加

ヨウ素酸カリウム標準溶液 1mL を加えた酸素瓶に希硫酸 1mL を加えて、マグネティックスターラー上で泡立たない程度に軽く撹拌する。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

7-3-6、固定試薬 II 添加

続いてⅡ液 1mL を加え 10 秒くらい撹拌する。ヨウ素が遊離して黄色を呈する。

7-3-7、固定試薬 I 添加

さらにⅠ液 1mL を加えて撹拌する。その後、瓶の首周辺に付着したⅠ液、Ⅱ液等を DIW で洗い流しながら、液量を瓶の肩口付近とする。

7-3-8、滴定

酸素瓶の側面をきれいに拭い、自動酸素滴定装置にセットして滴定を開始する。滴定が終了したら、滴定曲線と滴定終点 V_1 [mL]が記録されていることを確認する。

7-3-9、2 本目の測定

ヨウ素酸カリウム標準溶液 2mL を加えた酸素瓶についても、7-3-5 から 7-3-8 の操作を行い、滴定終点 V_2 [mL]を求める。

7-3-10、試薬ブランクの計算

式 12 に V_1 と V_2 を代入し、試薬ブランクを計算する。上述の試薬ブランク測定を複数回（2～3 回）繰り返し、それらの平均値（V_{blk} [ml]）を求める。

8、濃度計算

溶存酸素濃度は、ヨウ素酸カリウム標準溶液で値付けされたチオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量から求められる。以下に、ヨウ素酸カリウム標準溶液（8-1）、チオ硫酸ナトリウム溶液（8-2）、そして試料中の溶存酸素（8-3）の各濃度の計算方法を順に述べる。なお、ここでは各溶液の調製に使用する DIW 中の妨害物質（10-2）の濃度は無視できると仮定している。

8-1、ヨウ素酸カリウム（KIO_3）標準溶液の濃度

8-1-1、重量モル濃度

KIO_3 標準溶液の重量モル濃度 $C_{KIO_3}\left[\mathrm{mol\cdot kg^{-1}}\right]$ は、次式で表される。

$$C_{KIO_3} = \frac{p_{KIO_3} \cdot w_{KIO_3} \cdot f_{buoy、KIO_3}}{m_{KIO_3} \cdot (w_{dw} + w_{KIO_3}) \cdot f_{buoy、dw}} \quad . \tag{13}$$

ただし、 p_{KIO_3} ： KIO_3 の純度、
w_{KIO_3} ： KIO_3 の重量 [g]（4-5-4）、
$f_{buoy、KIO_3}$ ：KIO_3 重量測定時の条件における浮力補正係数（11-3-3）、
m_{KIO_3} ：KIO_3 の分子量（= 214.001、日本化学会、2012）、
$w_{dw} + w_{KIO_3}$ ： DIW と KIO_3 の重量 [kg] （4-5-5）、
$f_{buoy、dw}$ ： KIO_3 標準溶液調製時の条件における浮力補正係数（11-3-3）。

8-1-2、容量モル濃度

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

液温t_L[℃]（7-2-3）における KIO_3 標準溶液の容量モル濃度$C_{KIO_3}(t_L)\left[\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\right]$は次式で計算できる。

$$C_{KIO_3}(t_L) = \frac{C_{KIO_3}\cdot \rho_w(t_L)}{1000} \ . \qquad (14)$$

ただし、 C_{KIO_3}：KIO_3 標準溶液の重量モル濃度[mol·kg^{-1}]（8-1-1）、
$\rho_w(t_L)$：KIO_3 標準溶液の液温t_Lにおける DIW の密度[kg·m^{-3}]（11-1）。厳密には、$\rho_w(t_L)$を KIO_3 標準溶液の密度とするべきであるが、希薄溶液（約 0.04%）なので DIW の密度で代用しても有意な差を生じない。

8-2、チオ硫酸ナトリウム（$Na_2S_2O_3$）溶液の濃度

8-2-1、KIO_3 標準溶液の分注量

KIO_3 標準溶液分注用のマイクロシリンジ（ビュレット）またはピペットの容量（5-2-4）は、分注時の液温t_L[℃]（7-2-3）に依存して膨張・収縮するために補正が必要である。マイクロシリンジまたはピペットの容量校正を実施した時の液温をt_C[℃]とすると、液温t_L[℃]における KIO_3 標準溶液の分注量$V_{KIO_3}(t_L)$ [mL]は次式で計算される。

$$V_{KIO_3}(t_L) = V_{KIO_3}(t_C)\cdot\{1+\alpha_v(t_L - t_C)\} \ , \qquad (15)$$

ただし、 $V_{KIO_3}(t_C)$ ： t_C[℃]における KIO_3 標準溶液の分注量[mL]（校正された値）
α_V ：分注器のマイクロシリンジ（ビュレット）の体膨張率（11-3-4）。

8-2-2、容量モル濃度

1 モルのヨウ素酸カリウムは 6 モルのチオ硫酸ナトリウムに相当するので（4-5）、チオ硫酸ナトリウム溶液の容量モル濃度$C_{Na_2S_2O_3}\left[\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\right]$は次式で求められる。

$$C_{Na_2S_2O_3} = 6\cdot C_{KIO_3}(t_L)\cdot V_{KIO_3}(t_L)/(V_{std} - V_{blk}) \ . \qquad (16)$$

ただし、 $C_{KIO_3}(t_L)$：液温t_L[℃]における KIO_3 標準溶液の容量モル濃度[mol·L^{-1}]（8-1-2）、
$V_{KIO_3}(t_L)$：液温t_L[℃]における KIO_3 標準溶液の分注量[mL]（8-2-1）、
V_{std} ： $Na_2S_2O_3$ 溶液の標定値[mL]（7-2-8）、
V_{blk} ： 試薬ブランク[mL]（7-3-10）。

8-3、試料中溶存酸素の濃度

8-3-1、試料中の酸素量

酸素瓶に採取された海水試料中の酸素量n_{sam} [mol]は、次式で与えられる。ただし、この式が正しいのは、海水試料の滴定（7-1）と標定（7-2）に用いたチオ硫酸ナトリウム溶液の容量モル濃度$C_{Na_2S_2O_3}\left[\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\right]$が等しい時だけである（厳密には、試薬ブランク測定時（7-3）の

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

濃度も同じでなければならない)。したがって標定は一連の試料測定の直前と直後に実施し、その間のチオ硫酸ナトリウム溶液の液温変化とそれに伴う容量モル濃度の変化を可能な限り小さくしなければならない。なお、式 16 と 17 からヨウ素酸カリウム 1 モルは溶存酸素 1.5 モルに対応することがわかる。

$$n_{sam} = \frac{1}{4} \cdot C_{Na_2S_2O_3} \cdot \frac{V_{tit} - V_{blk}}{1000} - DO_{reg} \ . \quad (17)$$

ただし、 $C_{Na_2S_2O_3}$：$Na_2S_2O_3$ 溶液の容量モル濃度[mol·L^{-1}]（8-2-2）、
V_{tit} ： 海水試料の滴定値[mL]（7-1-6）、
V_{blk} ： 試薬ブランク[mL]（7-3-10）、
DO_{reg} ：固定試薬Ⅰ液およびⅡ液（2mL）中の飽和酸素量、7.6×10^{-8}[mol]（Murray et al., 1968）。厳密には容量検定された固定試薬溶液量（5-1-3）を用いるべきだが、濃度計算への寄与が小さいので液量は 2mL として計算している。

8-3-2、酸素瓶の容量

海水試料を酸素瓶に分取した時の水温t_s[℃]（6-8）における酸素瓶の容量$V_{flask}(t_s)$[mL]は、次式で求められる。

$$V_{flask}(t_s) = V_{flask}(t_c) \cdot \{1 + \alpha_v(t_s - t_c)\} \ . \quad (18)$$

ただし、 $V_{flask}(t_c)$：容量校正を実施した時の液温t_c[℃]における酸素瓶の容量 [mL]（5-1-1）、
α_v：酸素瓶の体膨張率（11-3-4）。

8-3-3、容量モル濃度

水温t_s[℃]おける海水試料中溶存酸素の容量モル濃度$C_{sam}(t_s)[mol \cdot L^{-1}]$は、固定試薬溶液が海水試料と置き換わることを考慮して、次式で求められる。

$$C_{sam}(t_s) = 1000 \cdot n_{sam} / \left(V_{flask}(t_s) - V_{reg}\right) \ . \quad (19)$$

ただし、 n_{sam}：海水試料中の溶存酸素量[mol]（8-3-1）、
$V_{flask}(t_s)$ ：水温t_s[℃]おける酸素瓶の容量[mL]（8-3-2）、
V_{reg} ：固定試薬Ⅰ液およびⅡ液の合計容量[mL]（5-1-3）。ここで固定試薬は常温（25.5℃）で保管されていると仮定して、液温変化よるその体積変化は無視している。

8-3-4、重量モル濃度

海水試料の塩分 S が決定したら水温t_s[℃]おける海水試料の密度$\rho(t_s、S)[kg \cdot m^{-3}]$を求め、容量モル濃度$C_{sam}(t_s)[mol \cdot L^{-1}]$をこの密度で除して、重量モル濃度$C_{sam}[mol \cdot kg^{-1}]$に変換する。なお、海水の密度の計算方法は、11-2 を参照されたい。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

$$C_{sam} = 1000 \cdot C_{sam}(t_s)/\rho_{sam}(t_s、S)\,. \qquad (20)$$

9、測定の不確かさ

従来、測定結果の信頼性（「精確さ」、accuracy）を表すために、精度（「ばらつき」、precision）と真度（「かたより」、trueness）という概念が用いられてきた。しかしこれらは原理的に不可知な「測定誤差」や「真値」を仮想しているために（「測定誤差」＝「測定値」−「真値」）、その評価や表現方法には少なからず混乱があった。そのため、1993 年に国際標準化機構を含む 7 つの国際機関の名前で、「計測における不確かさの表現のガイド」（Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement、 GUM）が出版された（2008 年に改訂、ISO, 2008）。GUM では測定結果の信頼性の新しい指標として「不確かさ（uncertainty）」を導入した。「不確かさ」は「測定の結果に付随した、合理的に測定量に結びつけられ得る値のばらつきを特徴づけるパラメータ」として定義されることからわかるように、測定の信頼性に関わるすべての要因をばらつきとして表現する。最終的には個々の要因によって生じる標準不確かさ u_1、u_2、u_3、…u_n を、次式で結びつけて合成標準不確かさ u_c を求める。

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}(u_i)^2}\ . \qquad (21)$$

ここでは、ウィンクラー法によって得られた溶存酸素濃度の不確かさを見積もった一例を挙げる。GUM の詳細については、他の解説書を参照されたい。

9-1、不確かさの主な要因

式 17 および 19 より溶存酸素の容量モル濃度$C_{sam}(t_s)[\mathrm{mol \cdot L^{-1}}]$は以下の式で求められる。

$$C_{sam}(t_s) = 1000 \cdot \left(\frac{1}{4} \cdot C_{Na_2S_2O_3} \cdot \frac{V_{tit} - V_{blk}}{1000} - DO_{reg}\right)/\left(V_{flask}(t_s) - V_{reg}\right). \qquad (22)$$

ただし、 $C_{Na_2S_2O_3}$：$Na_2S_2O_3$ 溶液の容量モル濃度[mol·L^{-1}]、
V_{tit} ：海水試料の滴定値[mL]、
V_{blk} ：試薬ブランク[mL]、
DO_{reg}：固定試薬Ⅰ液およびⅡ液中の飽和酸素量[mol]、
$V_{flask}(t_s)$ ：水温t_s[℃]おける酸素瓶の容量[mL] 、
V_{reg}：固定試薬Ⅰ液およびⅡ液の合計容量 [mL] 。

DO_{reg}は実測された値ではないため、その相対的な不確かさは大きい。しかし、その量（7.6×10^{-8}[mol]）は試料中溶存酸素量に比べて少ないので、DO_{reg}に起因する溶存酸素濃度の不確かさは小さいと考えられる（溶存酸素濃度が 10μmol·L^{-1} と低い場合でも、DO_{reg}は試料中溶存酸素量の 1/10 以下）。また、V_{blk}とV_{reg}はそれぞれV_{tit}と$V_{flask}(t_s)$に対して 1/10～1/1000、約 1/50 と小さい。したがって溶存酸素の容量モル濃度の不確かさは、主に$C_{Na_2S_2O_3}$、V_{tit}、及び$V_{flask}(t_s)$の 3 つに依存すると仮定した。また、海水密度に起因する不確かさを無視できる仮

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

定すると、容量モル濃度[mol·L^{-1}]と重量モル濃度[mol·kg^{-1}]の不確かさは等しくなる。

9-2、チオ硫酸ナトリウム溶液濃度の不確かさ

$C_{Na_2S_2O_3}$、すなわちチオ硫酸ナトリウム溶液の容量モル濃度は、ヨウ素酸カリウム標準溶液の容量モル濃度$C_{KIO_3}(t_L)$とその分注量$V_{KIO_3}(t_L)$、チオ硫酸ナトリウム溶液の標定値V_{std}、試薬ブランクV_{blk}から計算される（8-2-2）。V_{blk}はV_{std}に対して小さいため、それに起因する不確かさはここでは無視できるとする。また適切に校正された電子天秤を用いてその容量を校正された$V_{KIO_3}(t_L)$の不確かさは他の要因のそれに比べて十分に小さいと考える。したがって$C_{Na_2S_2O_3}$の不確かさは、主に$C_{KIO_3}(t_L)$及びV_{std}に依存すると仮定した。式 13 と 14 から、$C_{KIO_3}(t_L)$の不確かさは主にヨウ素酸カリウムの純度（p_{KIO_3}）、分子量（m_{KIO_3}）、電子天秤によるヨウ素酸カリウムの秤量（w_{KIO_3}）の不確かさによると考えられる（その他の要因、すなわち浮力補正、DIW（+KIO_3）重量測定、重量濃度から容量量濃への換算に起因する不確かさは無視できるものとした）。標準として認証標準物質「NMIJ CRM 3006-a」（4-5）を用いた場合、その純度に起因する標準不確かさは 0.0090%として与えられる。分子量の標準不確かさは、約 0.0080%である。試薬秤量の不確かさは電子天秤の仕様に依存するが、手元の電子天秤（分銅によって校正済）による秤量の標準不確かさは、約 0.027%と求められた。したがってヨウ素酸カリウム溶液濃度$C_{KIO_3}(t_L)$の合成標準不確かさは、上記 3 つの標準不確かさを式 21 に代入して 0.030%と計算される。一方で、V_{std}の標準不確かさは標定の繰り返し測定（7-2-8）の標準偏差とみなすことができる。我々の自動滴定装置による標定の相対的な標準偏差は、約 0.02%である。したがって、チオ硫酸ナトリウム溶液濃度$C_{Na_2S_2O_3}$の合成標準不確かさは、$C_{KIO_3}(t_L)$とV_{std}の標準不確かさから約 0.036%と計算される。ただし、この値にはチオ硫酸ナトリウム溶液の液温変化に起因する不確かさは含まれていない。

9-3、合成標準不確かさ

酸素瓶の容量$V_{flask}(t_s)$の標準不確かさは、瓶容量検定時の繰り返し測定の標準偏差とみなすことができる（電子天秤を用いた秤量値に起因する不確かさは十分に小さいと仮定した）。我々が実施した瓶容量検定の結果から、その繰り返し測定の相対的な標準偏差は約 0.015%と見積もられている。一方、試料滴定値V_{tit}の標準不確かさは、同一海水試料を複数回繰り返し測定した時に得られる標準偏差とみなすことができる（この不確かさの中には海水試料の分取、固定作業に起因する不確かさも含む）。これは、一連の試料分取・測定を実施している間に、可能な限り多くの試料について、同一試料 2 検体のペアを測定する（replicate 測定）ことから求めることができる。n 個の replicate 測定ペアの差（d_1、 d_2、 d_3、 …d_n）から、標準偏差 S を求めるためには以下の式を用いる。

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}(d_i)^2/2n} \ . \qquad (23)$$

我々の自動滴定装置を用いた分析では、その標準偏差として約 0.1μmol·kg^{-1} という値が得られている。この値は、溶存酸素濃度 250μmol·kg^{-1} の試料の場合には相対的な標準偏差 0.040%に相当する。最終的に、溶存酸素濃度の合成標準不確かさはチオ硫酸ナトリウム溶液濃度$C_{Na_2S_2O_3}$、酸素瓶容量$V_{flask}(t_s)$、そして試料滴定値V_{tit}の標準不確かさ（それぞれ、0.036%、

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

0.015%、0.040%）から、0.056%と計算される（k=2 の拡張不確かさは、その倍の 0.11%となる）。この合成標準不確かさは、溶存酸素濃度 250μmol·kg^{-1} の試料の場合には 0.14μmol·kg^{-1} に相当する（拡張不確かさは 0.28μmol·kg^{-1}）。試料滴定値V_{tit}の標準不確かさは、試料中溶存酸素濃度が低くなるにつれて相対的に大きくなる（標準偏差 0.1μmol·kg^{-1} は、溶存酸素濃度が 100μmol·kg^{-1}、10μmol·kg^{-1} の場合には、それぞれ標準不確かさ 0.10%、1.0%に相当する）。したがって、ウィンクラー法による溶存酸素測定の合成標準不確かさを小さくするためには、試料滴定値の標準不確かさを小さくすることが必要とされる。ただし、ここで求められた合成標準不確かさには、試料に含まれる妨害物質（10-2）に起因する不確かさが含まれていないことに注意しなければならない。

10、トレーサビリティと妨害物質

10-1、トレーサビリティ（traceability）

トレーサビリティとは、「不確かさがすべて標記された、切れ目のない比較の連鎖を通じて、通常は国家標準又は国際標準である決められた標準に関連づけられ得る測定結果又は標準値の性質」と定義されている（ISO, 2015）。国際 SI 単位系にトレーサブルである認証標準物質である「NMIJ CRM 3006-a」（4-5）を用いることで、ウィンクラー法による溶存酸素濃度はトレーサビリティを得ることが可能である。トレーサビリティを確立するために、標準溶液であるヨウ素酸カリウム溶液を新しいものに交換する際には、古い溶液と新しい溶液を同時に標定し、両者が不確かさ（9-2）の範囲で一致することを確認する。また、適切に保管されたヨウ素酸カリウム標準溶液の濃度は数年間安定であるので（4-5-7）、適宜過去の分析に用いた標準溶液を現在使用しているものと一緒に標定し、両者を比較することも有効である。さらに、可能であれば他機関と標準溶液を交換して相互比較を実施することも推奨される。

ウィンクラー法による溶存酸素濃度の測定には、いくつかの妨害物質が存在する（10-2）。したがって厳密には、ウィンクラー法によって測定された溶存酸素濃度のトレーサビリティを担保するためには、不確かさが付与された妨害物質濃度が必要となる。海水試料に含まれる妨害物質濃度の測定方法は 10-2 に記すが、一部の貧酸素水を除き外洋水中の妨害物質濃度は 1 μmol·kg^{-1} 以下である。ここで妨害物質濃度を 0.50 ± 0.50 μmol·kg^{-1}、その確率分布を矩形と仮定すると、その標準不確かさは 0.29 μmol·kg^{-1}（$= 0.50/\sqrt{3}$）となる。この値は、溶存酸素濃度 250μmol·kg^{-1} に対する相対的な標準不確かさ 0.12%に相当する。これを 9-3 で得られた、妨害物質濃度に起因する不確かさを含まない標準不確かさ 0.056%に加味すると、最終的に 0.13%、濃度に換算して 0.32μmol·kg^{-1} という合成標準不確かさを得る。また k=2 の拡張不確かさは、それぞれ 0.26%と 0.64μmol·kg^{-1} となる。したがって通常の外洋水に限れば、ウィンクラー法による溶存酸素濃度は、250μmol·kg^{-1} に対して拡張不確かさ 0.64μmol·kg^{-1} の範囲でトレーサビリティを担保することができる。ただしこの場合には、仮定された妨害物質濃度（0.5 μmol kg^{-1}）を差し引いていることを明記する必要がある。

10-2、妨害物質

外洋水中の主要な妨害物質は、ヨウ素酸イオン、亜硝酸イオン、過酸化水素である。一部

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

の貧酸素水を除き、これら妨害物質濃度を溶存酸素に換算した濃度（海水ブランク濃度）は 1 μmol·kg^{-1}以下であるが、繰り返し測定精度 0.1μmol·kg^{-1}の測定ではその濃度を無視できない。以下に、海水ブランクの定量方法（10-2-1）、ヨウ素酸イオン（10-2-2）、亜硝酸イオン（10-2-3）、過酸化水素による妨害（10-2-4）、そして最後にウィンクラー法による貧酸素水中の溶存酸素濃度の測定例（10-2-5）について順に述べる。

10-2-1、海水ブランクの定量

海水試料に含まれる妨害物質を滴定するために必要なチオ硫酸ナトリウム溶液の量を、海水ブランクと称する。海水ブランク（V_{sw-blk}[mL]）は、以下の式で見積もることができる。

$$V_1 = V_P + V_{blk}, \quad (24)$$

$$V_3 = V_P + V_{sw-blk} + V_{blk}\ , \quad (25)$$

$$V_{sw-blk} = V_3 - V_1, \quad (26)$$

ただし、 V_1 :KIO_3溶液の一定量をチオ硫酸ナトリウム$Na_2S_2O_3$溶液で滴定した時の滴定終点[mL]、
V_3 ： 目的海水試料に一定量の KIO_3 溶液を加えたものを同じ $Na_2S_2O_3$ 溶液によって滴定することで得られた終点[mL]、
V_p ：KIO_3 溶液の一定量の滴定に必要な $Na_2S_2O_3$ 溶液量[mL]、
V_{blk} ：試薬ブランク[mL]。

V_1 は、試薬ブランク（7-3）の測定時に得られた値を使うことができる。V_3 は、試薬ブランクの測定操作において、DIW を目的海水試料に置き換えることで求めることができる。具体的な操作は 7-3-3～7-3-8 に準じるが、海水ブランクは試料量に依存するため、測定に供された試料の体積が必要となる。酸素瓶はその容量が既知であるので、試料の体積測定はそれを利用するとよい。すなわち手順 7-3-3 は、「酸素瓶に海水試料を分取し、測温後栓をする。瓶のカラーに残った海水を拭き取り、栓を取り外す。栓の表面についた海水を少量の DIW で酸素瓶内に洗い流し、撹拌子を入れる」、手順 7-3-4 は「容量検定済の分注器を用いて酸素瓶にヨウ素酸カリウム標準溶液を 1mL 注入する。」となる。チオ硫酸ナトリウム溶液濃度 $C_{Na_2S_2O_3}$[mol·L^{-1}]（8-2-2）と、海水試料の温度t_s[℃]における酸素瓶容量$V_{flask}(t_s)$[mL]（8-3-2）から、海水ブランク濃度$C_{sw-blk}(t_s)$[mol·L^{-1}]が計算される。

$$C_{sw-blk}(t_s) = \frac{1}{4} \cdot C_{Na_2S_2O_2} \cdot V_{sw-blk} / V_{flask}(t_s)\ . \quad (27)$$

この方法によって試料毎に海水ブランク濃度を定量すると滴定作業が倍増するため、試料数が多い場合には負担が大きい。一般的な外洋水の場合には、10-1 で示したように海水ブランク濃度を測定することなく、1 μmol·kg^{-1} 以下の海水ブランク濃度に起因する不確かさを含んだ値を報告することが現実的であろう。しかし、下記に示すように貧酸素水や陸水の影響の大きい沿岸水では妨害物質濃度が高い場合があるので、そのような海水試料をウィンクラー法で測定する際には、海水ブランク濃度の定量が推奨される。

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

10-2-2、ヨウ素酸

通常の外洋水の場合、その海水ブランクの多くがヨウ素酸イオンに起因することがわかっている。前節 10-2-1 の方法で得られた北太平洋亜熱帯域における海水ブランク濃度の測定例を図 2 に示す。表層有光層（0～150m）は約 0.4～0.5 μmol·kg^{-1}、深層では約 0.6～0.7 μmol·kg^{-1} という値が得られている。一方、外洋深層水のヨウ素酸カリウム濃度は約 0.5 μmol·L^{-1} でほぼ均一であり、表層有光層では生物活動の影響でその濃度より低くなっている（約 0.35 μmol·L^{-1}）ことが報告されている（Wong and Li, 2009）。ウィンクラー法では、ヨウ素酸カリウム濃度の 1.5 倍が溶存酸素濃度に相当する（8-3-1）。したがって、ヨウ素酸カリウム濃度約 0.35、0.5 μmol·L^{-1} はそれぞれ溶存酸素濃度の約 0.52、0.75 μmol·L^{-1} に相当し、図 2 に示された海水ブランク濃度とよく一致する。

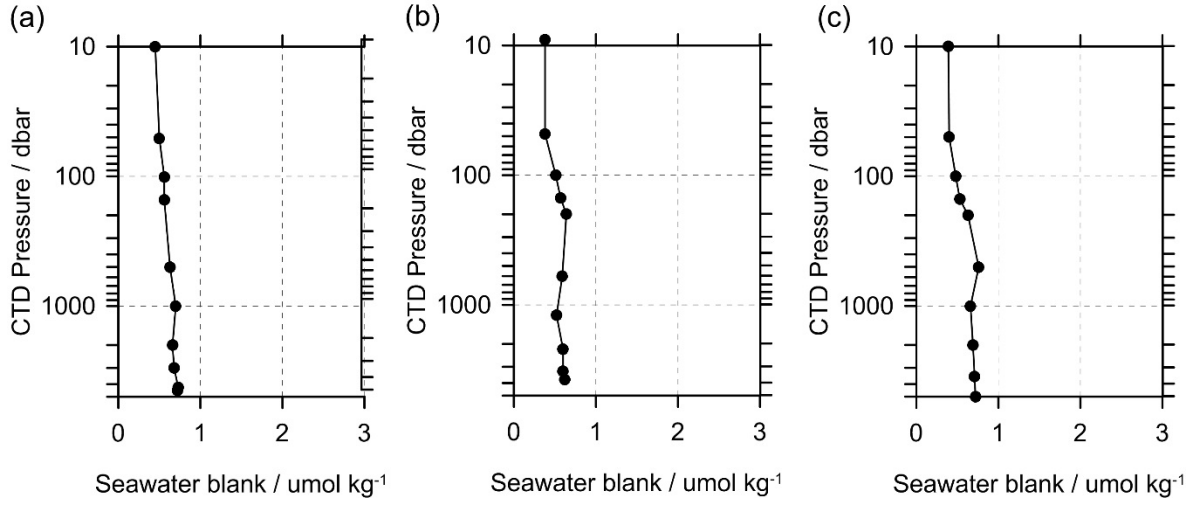

図 2　国立研究開発法人海洋研究開発機構「みらい」MR05-05 航海（2005 年 11 月～2006 年 1 月）で測定された海水ブランク濃度（μmol· kg^{-1}）の鉛直分布（縦軸は対数になっている）。（a）29.1° N / 123.9° W、（b）25.5° N / 164.3° W、（c）24.2° N / 172.8° E。

10-2-3、亜硝酸

亜硝酸イオンは、酸性下で次の反応式によってヨウ素イオンを遊離ヨウ素に酸化する。

$$2NO_2^- + 2I^- + 4H^+ \rightarrow I_2 + 2NO + 2H_2O\ . \qquad (28)$$

ウィンクラー法では、遊離ヨウ素 1 モルは溶存酸素 0.5 モルに相当するため、亜硝酸イオン 1 モルは、溶存酸素 0.25 モルに相当する。試料に溶存酸素が存在する場合、式 28 で生成した一酸化窒素は、次式によって溶存酸素と反応し、亜硝酸イオンが再生される。

$$2NO + O_2 + H_2O \rightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+\ . \qquad (29)$$

再生された亜硝酸イオンは、式 28 によって再びヨウ素イオンを酸化する。したがって、

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

ヨウ素イオンと溶存酸素が十分量あって、式 28 と 29 の反応が完全に進行した場合、反応式は以下のようにまとめられる。

$$NO_2^- + 2I^- + 2H^+ + O_2 \rightarrow I_2 + H_2O + NO_3^- . \quad (30)$$

この場合、亜硝酸イオン 1 モルは、溶存酸素 0.5 モルに相当する。試料に亜硝酸塩を添加しウィンクラー法で溶存酸素を測定した実験によると、亜硝酸イオン濃度とウィンクラー法で測定された「溶存酸素」濃度のモル比として、0.25 と 0.5 の間の 0.35 という平均値が報告されている（Wong, 2012）。通常の外洋域においては、植物プランクトンの光合成活動が活発な有光層中で最大約 1 μmol·kg^{-1} 程度の亜硝酸濃度が測定される。この場合、亜硝酸イオンによるウィンクラー法で測定された溶存酸素濃度への正のバイアスは、0.35 μmol·kg^{-1} となる。しかし、ペルー沖などの貧酸素海域では、高濃度の亜硝酸（～10 μmol·kg^{-1}）が観測されており、そこでは亜硝酸による妨害が数 μmol·kg^{-1} になる可能性がある（10-2-5）。

亜硝酸イオンによる妨害は、固定試薬にアジ化ナトリウム（NaN_3）を添加することで防ぐことができる（Barnett and Hurwitz, 1939）。

$$3N_3^- + NO_2^- + 4H^+ \rightarrow 5N_2 + 2H_2O . \quad (31)$$

この方法は、「ウィンクラー法アジ化ナトリウム変法」として、高濃度の亜硝酸イオンを含む工業廃水中の溶存酸素濃度の測定方法として、国内でも普及している（日本工業規格、2013）。具体的には、固定試薬「Ⅱ液」（4-2）1L に対してアジ化ナトリウム 10g を添加するのみで、その他の操作は通常のウィンクラー法と同じである。アジ化ナトリウムは式 9 の反応を阻害するという報告もあるが、Wong (2012)によるとアジ化ナトリウムの有無による有意な測定結果の差は認められていない。高濃度の亜硝酸が含まれていることが予めわかっている試料をウィンクラー法で測定する場合、このアジ化ナトリウム変法は有効である。ただし、アジ化ナトリウムは有毒物質であるため、それを含む試薬や廃液は適切に取り扱わなければならない。

10-2-4、過酸化水素

過酸化水素は、ヨウ素酸イオン、亜硝酸イオンと同じく、ウィンクラー法による溶存酸素濃度測定時の正の妨害物質である。過酸化水素は、酸性下で次の反応式によってヨウ素イオンを遊離ヨウ素に酸化する。

$$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ \rightarrow I_2 + 2H_2O . \quad (32)$$

ウィンクラー法では、遊離ヨウ素 1 モルは溶存酸素 0.5 モルに相当するため、過酸化水素 1 モルは、溶存酸素 0.5 モルに相当する。この化学式の反応速度は DIW 中では遅いが、固定試薬に含まれているマンガンイオン（Mg^{2+}）が触媒として作用するために、ウィンクラー法による測定では過酸化水素が妨害物質となる（Wong et al., 2010）。過酸化水素は専ら有機物

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

の光化学反応で生成されるため、その濃度は外洋域の有光層中で 0.06～0.3 μmol·L^{-1}、深層で 0.01 μmol·L^{-1} 以下であり（Wong et al., 2010）、これらは最大で溶存酸素濃度 0.15 μmol·kg^{-1} に相当する。この値は、ヨウ素酸イオンや亜硝酸イオンの妨害に比較して相対的に小さい。しかし、有機物濃度が高い沿岸海域、河川水の影響の大きな河口周辺海域では、1 μmol·L^{-1} 以上の過酸化水素濃度が観測されているので（Wong et al., 2010）、注意が必要である。

10-2-5、ウィンクラー法による貧酸素水中溶存酸素濃度の測定例

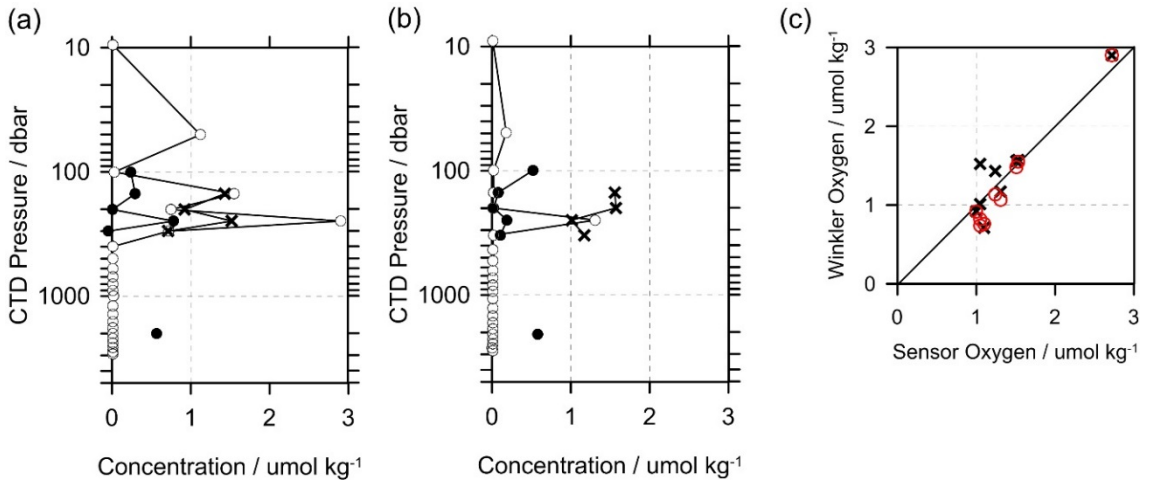

図 3　国立研究開発法人海洋研究開発機構「みらい」MR09-01 航海（2009 年 4 月～6 月）において南太平洋東部亜熱帯域（a：16.7° S/77.3° W、b：16.7° S/78.0° W）で測定された海水ブランク濃度（μmol· kg^{-1}、●）、亜硝酸濃度（μmol· kg^{-1}、○）、ウィンクラー法で測定された溶存酸素濃度（μmol· kg^{-1}、×）の鉛直分布。（c）ウィンクラー法と現場センサーで測定された溶存酸素濃度（μmol· kg^{-1}）の比較。ただし溶存酸素濃度 3 μmol· kg^{-1} 以下のデータのみを表示している。○は海水ブランク濃度で補正された、×は補正される前のウィンクラー法で測定された溶存酸素濃度を示す。

図 3a と 3b に、南太平洋東部熱帯域においてウィンクラー法によって測定された溶存酸素（ただし 3 μmol·kg^{-1} 以下のデータのみ表示、×）、亜硝酸（○）、海水ブランク（●）の各濃度の鉛直分布を示す。ペルー沖の同海域では、赤道湧昇流によって表層にもたらされた豊富な栄養塩によって植物プランクトンによる有機物生産が活発である。そのため、有光層直下の深度数百 m 層ではそれら有機物の分解のために溶存酸素が消費され、その濃度が 10 μmol·kg^{-1} 以下の貧酸素水（suboxic water）が存在する。そこでは硝酸還元により亜硝酸濃度が上昇する一方で、ヨウ素酸イオンはヨウ素イオンに還元されて枯渇する（Rue et al., 1997）。その結果、海水ブランク濃度（●）は、亜硝酸イオン濃度（○）の上昇とヨウ素酸イオン濃度の低下を反映したものとなる。得られた海水ブランク濃度を用いて溶存酸素濃度を補正したところ、補正前の値に比べて現場センサーで測定された溶存酸素濃度との相関が改善された（図 3c）。現場センサーによる測定値は、ウィンクラー法によって測定された通常の海水試料中の溶存酸素濃度によって校正されており、図 3c に示した相関関係の改善は、海水ブランク濃度による補正によってより正確な溶存酸素濃度が得られることを示している。

さらに溶存酸素濃度が低下し無酸素状態に近くなった海水（anoxic water）では、硫酸の還

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

元によって亜硫酸や硫化物が生成する。また、海底堆積物に接している極低酸素な底層水では、海底堆積物から金属イオンが溶出することもある。これらの亜硫酸イオン、硫化物、金属イオンも、ウィンクラー法の妨害物質として知られている。海水ブランク濃度の測定によってこれら妨害物質の影響を補正することは原理的には可能であるが、試料採取時の大気中酸素からの汚染や滴定終点を適正に得ることが難しいことなどの問題もあり、無酸素状態に近い海水試料中の極微量溶存酸素をウィンクラー法で測定することは困難である。

11、付録

11-1、純水の密度

純水と海水の密度については、これまでの状態方程式（International Equation of State of Seawater 1980, EOS-80）に代わって、2010 年に新しい状態方程式が提案された（Thermodynamic Equation of Seawater 2010, TEOS-10）。しかし、溶存酸素濃度を容量モル濃度から重量モル濃度に換算する際に（8-3-4）、従来の EOS-80 の諸式を用いても実質的な差は生じない。ここでは、EOS-80 による海水密度の計算方法（UNESCO, 1981）を記述する。TEOS-10 については、本ガイドライン第 1 巻第 6 章を参照されたい。

1 気圧における水温t[℃]の純水の密度$\rho_w(t)\ [\mathrm{kg\cdot m^{-3}}]$は、次式で求められる。ここで純水は、平均標準海水（Standard Mean Ocean Water, SMOW）と同じ同位体組成比（Craig, 1961）を持つと仮定されている。

$$\rho_W(t) = a_0 + a_1 \cdot t + a_2 \cdot t^2 + a_3 \cdot t^3 + a_4 \cdot t^4 + a_5 \cdot t^5 \quad . \tag{33}$$

ここで、 $a_0 = +999.842594$

$a_1 = +6.793952 \times 10^{-2}$

$a_2 = -9.095290 \times 10^{-3}$

$a_3 = +1.001685 \times 10^{-4}$

$a_4 = -1.120083 \times 10^{-6}$

$a_5 = +6.536332 \times 10^{-9}$

水温t[℃]は 1968 年国際実用温度目盛（International Practical Temperature Scale of 1968, IPTS-68）であり、0～40℃の範囲で有効である。現在、温度は 1990 年国際温度目盛（International Temperature Scale of 1990, ITS-90）によって標準の体系が確立されている。ITS-90 と IPTS-68 の関係は以下の式で近似できる（Jones and Harris, 1992）。

$$\text{ITS-90} = 0.0002 + 0.99975 \cdot \text{IPTS-68} \ . \tag{34}$$

この式は、0~40℃の範囲で有効である。

11-2、海水の密度

1 気圧における水温t[℃]、塩分 S の海水の密度$\rho(t、S)\ [\mathrm{kg\cdot m^{-3}}]$は、次式から求めることが

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

できる。

$$\rho(t、S) = \rho_W(t) + (b_0 + b_1 \cdot t + b_2 \cdot t^2 + b_3 \cdot t^3 + b_4 \cdot t^4) \cdot S + (c_0 + c_1 \cdot t + c_2 \cdot t^2) \cdot S^{\frac{3}{2}} + d_0 \cdot S^2 \ . \quad (35)$$

ここで、 $\rho_W(t)$ ：純水の密度[kg·m^{-3}]（11-1）

$b_0 = +8.24493 \times 10^{-1}$　　$c_0 = -5.72466 \times 10^{-3}$

$b_1 = -4.0899 \times 10^{-3}$　　$c_1 = +1.0227 \times 10^{-4}$

$b_2 = +7.6438 \times 10^{-5}$　　$c_2 = -1.6546 \times 10^{-6}$

$b_3 = -8.2467 \times 10^{-7}$

$b_4 = +5.3875 \times 10^{-9}$　　$d_0 = +4.8314 \times 10^{-4}$

この式は、水温 t[℃]（IPTS-68）は−2～40℃の範囲で有効である。また塩分 S は実用塩分（Practical Salinity Scale of 1978, PSS-78）であり、0～42 の範囲で有効である。

11-3、定容器具の容量校正

ウィンクラー法による溶存酸素濃度の測定では、多くの定容器具、すなわち酸素瓶（5-1-1）、固定試薬用分注器（5-1-3）、チオ硫酸ナトリウム溶液用マイクロシリンジ（ビュレット）（5-2-1）、ヨウ素酸カリウム標準溶液用分注器（5-2-4）を使う。そのため、分析の不確かさを小さくするためには、分析に先だってそれら定容器具の容量を校正しておく必要がある。定容器具の校正は、測温された DIW を満たすか排出した時の重さを電子天秤で測定して行う。また、校正時と使用時の温度差に伴う膨張・収縮によって定容器具の容量が増減するため、これを補正しなければならない。

11-3-1、電子天秤の準備

重量測定に用いる電子天秤は、測定の一時間ほど前にスイッチを入れておき、測定に入る前に基準分銅で校正を行う。外部分銅を取り扱うときには必ず手袋を着用し、直接手を触れてはならない。測定の読みとり最小値は、容量の校正をするものによって異なるが、酸素瓶用の200 [g] 分銅(ClassE2:±0.3mg)では0.001 [g] 単位まで読みとり、同時に室温も測定する。測定は数回繰り返し、安定した値の平均値を校正重量とする。

11-3-2、定容器具の容量

校正時の温度 t_c [℃] における定容器具の容量 $V(t_c)$ [mL] は、その器具を満たした、あるいはその器具から排出された純水の質量をその密度で割って得られる。温度の測定は、校正済の水銀棒状温度計を用いる。

$$V(t_c) = 1000 \cdot w_w \cdot f_{buoy} / \rho_w(t_c) \ . \quad (36)$$

ただし、 w_w ： 空気中で測定された純水の重さ [g]、

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015　G301JP: 001-030

f_{buoy} ： 浮力補正係数（11-3-3）、
$\rho_w(t_c)$ ：水温 t_c [℃] における純水の密度 [kg·m^{-3}]（11-1）。

11-3-3、浮力補正係数

空気中にある物体は空気による浮力を受けているので、真の質量を知るには測定された重量に浮力補正を施す必要がある。浮力補正係数f_{buoy}は次式で与えられる：

$$f_{buoy} = \frac{1-\rho_{air}/\rho_{weights}}{1-\rho_{air}/\rho_{sample}} \quad . \tag{37}$$

ただし、 ρ_{air} ： 重量測定時の湿潤空気の密度[g·cm^{-3}]、
ρ_{sample} ： 測定しようとする試料の密度[g·cm^{-3}]、
$\rho_{weights}$ ： 分銅の密度、検定証書に示されている公称値[g·cm^{-3}]。

式 37 の湿潤空気の密度ρ_{air} [g·cm^{-3}]は次式で与えられる（Jones, 1978）：

$$\rho_{air} = \frac{0.0034848(p-0.0037960U\cdot e_s)}{t+273.15} \quad , \tag{38}$$

ここで、 p： 気圧 [kPa]、
U： 相対湿度 [%]、
t ： 気温 [℃]、
e_s ： 飽和水蒸気圧 [kPa], $(= 1.7526 \times 10^8 \exp\{-5315.56/(t+273.15)\})$

11-3-4、定容器具の容量の温度変化補正

容量校正時の温度 t_c [℃] における定容器具の容量 $V(t_C)$ と、使用（測定）時の温度 t_M [℃] における容量 $V(t_M)$ との関係は以下の式で表される。

$$V(t_M) = V(t_C)\cdot\{1+\alpha_v(t_M-t_C)\} \quad , \tag{39}$$

ただし、α_v ：容器の材質の体膨張率$\left(\frac{1}{V}\frac{dV}{dt}\right)$ [℃$^{-1}$]である。

体積要素を$V = l^3$ とおいてα_vを線膨張率α_l、 $\left(\frac{1}{l}\frac{dl}{dt}\right)$ を用いて表すと、

$$\alpha_v = \frac{1}{V}\frac{dV}{dt} = \frac{1}{l^3}\frac{dV}{dl}\frac{dl}{dt} = \frac{1}{l^3}\cdot 3l^2\cdot\frac{dl}{dt} = 3\frac{1}{l}\frac{dl}{dt} = 3\alpha_l \quad , \tag{40}$$

となるので、体膨張率は線膨張率の 3 倍にほぼ等しい。したがって、体膨張率が明示されていない材質の場合も、線膨張率が分かれば計算によって求めることができる。多くの定容器具の材質であるガラスの線膨張率は、ソーダ石灰ガラスで 9.5×10^{-6} [℃$^{-1}$]以下、ホウケイ

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015 G301JP: 001-030

酸ガラスで 3.5×10^{-6} [℃$^{-1}$]以下であるので（日本工業規格、1994）、ガラスの体膨張率は 1～3×10^{-5} [℃$^{-1}$]となる。すなわち、10℃の温度変化があっても生じる容量変化は 0.03%以下である。

引用文献

Barnett, G. R. and E. Hurwitz (1939): The Use of Sodium Azide in the Winkler Method for the Determination of Dissolved Oxygen, Sewage Works Journal, 11, 781–787.

Broenkow, W. W. and J. D. Cline (1969): Colorimetric determination of dissolved oxygen at low concentrations, Limnology and Oceanography, 14, 450–454.

Carpenter, J. H. (1965a): The Chesapeake Bay Institute technique for the Winkler dissolved oxygen method. Limnology and Oceanography, 10, 141–143.

Carpenter, J. H. (1965b): The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. Limnology and Oceanography, 10, 135–140.

Craig, H. (1961): Isotopic variations in meteoric waters, Science, 133, 1702–1703.

Culberson, C. H. (1991): Dissolved Oxygen. In WOCE Operations Manual, Part 3.1.3 : WHP Operations and Methods, WHP Office Report WHPO 91-1, WOCE Report No. 68/91. Available online at: http://www.nodc.noaa.gov/woce/woce_v3/wocedata_1/whp/manuals.htm.

Culberson, C. H., G. Knapp, R. T. Williams, and F. Zemlyak (1991): A comparison of methods for the determination of dissolved oxygen in seawater, WHP Office Report WHPO 91-2, WOCE Report No. 73/91. Available online at: http://darchive.mblwhoilibrary.org/bitstream/handle/1912/243/WHPO-91-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Dickson, A. G. (1996): Determination of dissolved oxygen in sea water by Winkler titration. In WOCE Operations Manual, Part 3.1.3 : WHP Operations and Methods, WHP Office Report WHPO 91-1, WOCE Report No. 68/91. Available online at: http://www.nodc.noaa.gov/woce/woce_v3/wocedata_1/whp/manuals.htm.

Grasshoff, K. (1976): 4. Determination of oxygen, p. 59–70. In Methods of Seawater Analysis, first edition, edited by K. Grasshoff, Verlag Chemie, Weinheim.

Hansen, H. P. (1999): 4. Determination of oxygen, p. 76–89. In Methods of Seawater Analysis, third, completely revised and extended edition, edited by K. Grasshoff, K. Kremling, and M. Ehrhardt, WILEY-VCH, Weinheim.

Horibe, Y., Y. Kodama, and K. Shigehara (1972): Errors in Sampling Procedure for the Determination of Dissolved oxygen by Winkler Method. Journal of Oceanographical Society of Japan, 28, 203–206.

ISO (2008): ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). Available at: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=50461

ISO (2015): Guide 30:2015 Reference materials -- Selected terms and definitions. Available at: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=46209

©熊本雄一郎，高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康，松本 慧太郎 2015

IUPAC (1997): Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Available online at: http://goldbook.iupac.org/

JGOFS (1994): Chapter 6. Determination of dissolved oxygen by Winkler procedure, p. 25–33. In JGOFS Protocols. Available online at: http://usjgofs.whoi.edu/JGOFS_19.pdf.

Jones, F. E. (1978): The Air Density Equation and the Transfer of the Mass Unit. Journal of Research of the National Bureau of Standards 83-5, 419–428.

Jones, F. E. and G. K. Harris (1992): ITS-90 density of water formulation for volumetric standards calibration, Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 97, 355–340.

河野健 (2010): 新しい海水の状態方程式と新しい塩分（Reference Composition Salinity）の定義について, 海の研究, 19, 127–137.

紀本電子工業株式会社（2009）: 溶存酸素滴定装置 DOT-05 取扱説明書　60pp. http://www.kimoto-electric.co.jp/support/pdf/DOT05_manual.pdf

気象庁(1999): 海洋観測指針（第 1 部）, 気象庁, 東京, 200 pp.

北野康 (1964): 淡水および海水中の溶存酸素測定法, 分析化学, 13, 573–577.

計量標準総合センター (2015): NMIJ 認証標準物質. https://www.nmij.jp/service/C/

Labasque, T., C. Chaumery, A. Aminotc, and G. Kergoat (2004): Winkler determination of dissolved oxygen: re-examination of critical factors and reliability, Marine Chemistry, 88, 53–60.

Langdon, C. (2010): Determination of dissolved oxygen in seawater by Winkler titration using the amperometric technique. In the GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines, edited by E. M. Hood, C. L. Sabine, and B. M. Sloyan, ICPO Publication Series Number 134. Available online at: http://www.go-ship.org/HydroMan.html.

宮尾孝, 梅田振一郎, 髙谷祐介, 永井直樹 (2013): 溶存酸素量測定の高精度化, 測候時報 第 80 巻特別号, S149–S157.

Murray, C. N., J. P. Riley, and T. R. S. Wilson (1968): The solubility of oxygen in Winklerreagents used for the determination of dissolved oxygen. Deep-Sea Research, 15, 237–238.

日本化学会 (2012): 日本化学会原子量専門委員会「原子量表（2012）」について. http://www.chemistry.or.jp/international/atomictable2012.pdf

日本工業規格 (1994): 化学分析用ガラス器具, JIS-R3503. http://kikakurui.com/r3/R3503-2007-01.html

日本工業規格 (2013): 工場排水試験方法, JIS- K 0102. http://kikakurui.com/k0/K0102-2013-01.html

Pai, S.-C., G.-C. Gong, and K.-K. Liu (1993): Determination of dissolved oxygen in seawater by direct spectrophotometry of total iodine, Marine Chemistry, 41, 343–351.

Rue, E. L., G. J. Smith, G. A. Cutter, and K. W. Bruland (1997): The response of trace element redox couples to suboxic conditions in the water column, DeepSea Research I, 44, 113–134.

Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons (1972): A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, 310 pp.

田中龍彦, 林裕也, 小宮佳和, 奈部川英則, 林英男 (2007): チオ硫酸ナトリウム溶液の安定性とヨウ素酸カリウムの電量ヨウ素滴定, 分析化学, 56, 327–332.

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

UNESCO (1981): Tenth report of the joint panel on oceanographic tables and standards. UNESCO technical papers in marine science 36, 25pp.

Winkler, L. W. (1888): Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffen. Berichte der Deutschen Gesellschaft, 21, 2843–2854.

Wong, G. T. F. (2012): Removal of nitrite interference in the Winkler determination of dissolved oxygen in seawater, Marine Chemistry, 130-131, 28–32.

Wong, G. T. F. and K.-Y. Li (2009): Winkler's method overestimates dissolved oxygen in seawater: Iodate interference and its oceanographic implications, Marine Chemistry, 115, 86–91.

Wong, G. T. F., Y.-C. Wu, and K.-Y. Li (2010): Winkler's method overestimates dissolved oxygen in natural waters: Hydrogen peroxide interference and its implications, Marine Chemistry, 122, 83–90.

©熊本雄一郎, 高谷 祐介、宮尾 孝、佐藤 弘康, 松本 慧太郎 2015

ガス分画連続流れ方式の分析装置を用いた
高精度で相互比較可能な海水中の溶存栄養塩類（N, P, Si）分析方法

○青山道夫（海洋研究開発機構 RCGC/福島大学環境放射能研究所）

要 約

全球海洋船舶観測プログラム（Global Ocean Ship-based Hydrographic Investigations Program: GO-SHIP）は、海洋物理、炭素循環、海洋生物地球化学、海洋生態系に興味を持つ科学者を、そして全球海洋気候観測システムの一部としての持続的な海洋観測断面の全球ネットワークを構築するための海洋内部データのユーザーおよびコレクターを集結させる。GO-SHIP において、1990 年代初頭の世界海洋循環実験（World Ocean Circulation Experiment: WOCE）で発展した一連のマニュアルおよびガイドラインの更新がなされている。WOCE で集積されたデータの解析によれば、もし栄養塩データを海洋内部の変化を確認するために用いるならば、栄養塩データの取得には一層の改善が必要であると示唆されている。このマニュアルの作成は、海水栄養塩参照物質（RMNS: Reference Materials for Nutrients in Seawater）の開発と同時進行しており、実にタイムリーである。やがて RMNS 溶液は十分な量が製造されるようになるとともに、航海中および航海間のいずれにおいても栄養塩分析の整合性向上の基盤となるに足る品質となる。

このマニュアルは、洋上での栄養塩分析における最良の手法・技法を提案する手引きである。洋上での溶存栄養塩類（通常 NH_4^+, NO_3^-, NO_2^-, PO_4^{3-}および Si）の分析にガス分画連続流れ方式の分析装置(CFA: Continuous Flow Analyser)を用いる際の、すべての手順に関する実験室での手法・技法について詳細な助言が提供されている。特定機器の使用や、他の出版物にきちんと記述されている関連した化学的手法について定めたものではない。

このマニュアルでは、最初に CFA 法、試料の採取と保存、試薬の準備とシステムの校正における考慮すべき事項を簡単に紹介する。次に、航海中および航海間のシステムのパフォーマンスを「追跡」するために、RMNS 溶液をどのように用いるか、議論する。さらに、報告したデータの品質評価がなされ、他のデータセットと比較できるようにするために、航海終了後、試料データと一緒に報告が求められるメタデータのフォーマットを提供する。

最も重要なことだが、このマニュアルには、定常的な最高品質データの取得における鍵となる手順に関して、詳細な情報を提供する「栄養塩標準操作手順（NSOP: Nutrient Standard Operating Procedures）」が付随されている。NSOP は、試料の採取と保存、洋上での CFA システムの使用、標準溶液の高精度な調製手順、真の校正ブランクの評価、検量線の直線性チェック、航海中および航海間におけるデータの繰り返し精度を管理するための内部・外部参照溶液の使用などをカバーしている。メタデータの報告例とともに、メタデータ報告の一部をなす品質管理と統計データのアセンブリ assembly に関する助言も含まれる。

この分析方法は、2010 年に出版された Hydes らによる“DETERMINATION OF DISSOLVED NUTRIENTS (N, P, SI) IN SEAWATER WITH HIGH PRECISION AND INTER-COMPARABILITY

USING GAS-SEGMENTED CONTINUOUS FLOW ANALYSERS”（Hydes et al., 2010） URL: http://www.go-ship.org/Manual/Hydes_et_al_Nutrients.pdf

を日本国内の複数の専門家の協力を得て、英語で出版された上記の分析方法を日本語に翻訳したものである。

2015 年 6 月 25 日時点では日本語翻訳版は未完であるが、栄養塩分析とガス分画連続流れ方式の分析装置(CFA)についての基本は本版に含まれているので、公表することとした。

個々に名前をあげることはしないが、翻訳版原案の一部を提供、あるいは原文との読み合わせを行い、記述を統一してくれた古くからの仕事仲間であり友人でもある方々に感謝します。

目 次

1. はじめに
1.1 本文書の手引き
1.2 海水の栄養塩類参照物質(RMNS)の活用
1.3 品質管理および品質保証の定義

2. 栄養塩分析とガス分画連続流れ方式の分析装置(CFA)
2.1 歴史的経緯
2.2 比色法の基礎
2.3 必要な手順
2.4 試料の採取
2.4.1 採水器
2.4.2 採水手順と注意事項
2.4.3 試料容器
2.4.4 試料の保存
2.5 分析装置の立ち上げ：構成の要点、その機能、気に留めておくべきこと
2.5.1 CFA のハードウェア
2.5.2 アセンブリとメンテナンス
2.6 試薬の調製
2.6.1 試薬の仕様
2.6.2 試薬の容器とメンテナンス
2.6.3 純水
2.6.4 洗浄液とブランク溶液
2.6.5 ブランクと洗浄液の選択
(日本語翻訳版はここまでおよび謝辞　2015 年 6 月 25 日現在)
2.7 校正用標準溶液の調製
2.7.1 標準溶液の調製手順
2.7.2 容量器具
2.7.3 ピペット類
2.8 誤差要因のチェックリスト

3. 品質保証
3.1 精度と正確さ
3.2 品質保証の技術
3.3 内部技法
3.3.1 重複測定
3.3.2 内部 QC テスト溶液
3.3.3 トラッキング溶液
3.4 部外の技法

3.4.1 他機関との共同実験

4. 校正の手順
4.1 校正用標準溶液の調製
4.2 栄養塩分析装置の校正
4.2.1 概観
4.2.2 ワーキング標準溶液
4.2.3 検量線の直線性（リニアリティ）
4.3 直線性の問題
4.3.1 2008 年実施の INSS (International Nutrients Scale System) 相互比較実験に提出されたデータに基づく非直線性の実例

5. RMNS 溶液の活用例
5.1 RMNS 溶液の活用による比較可能性（コンパラビリティ）の向上例

6. 栄養塩類分析データおよびメタデータの報告
6.1 栄養塩データ報告のチェックリスト

7. 謝辞

8. 参照文献

付録：栄養塩標準操作手順(Nutrient Standard Operating Procedures: NSOP)

NSOP 1　浮力補正の適用
NSOP 2　容量容器（メスフラスコおよびピペット）の重量法による検定
NSOP 3　標準溶液の調製
NSOP 4　検量線の直線性確立
NSOP 5　真のブランク値の決定
NSOP 6　トラッキング標準溶液の使用による、1 連の測定内での栄養塩分　　析の繰り返し精度の向上
NSOP 7　栄養塩試料の採水と保管
NSOP 8　低栄養塩海水の採水と保管
NSOP 9　洋上での CFA 標準操作手順例
NSOP 10　管理図 (control charts) の準備
NSOP 11　品質評価で用いる統計手法
NSOP 12　栄養塩メタデータ報告に求められること

1、はじめに

1.1 本文書の手引き

本文書は、CFA システムを用いた海水中の栄養塩測定に関して、最良の実施を促すものである。ここには適切な分析品質評価の手順を含む、海水栄養塩分析の改善に向けた系統的なアプローチが記述されている。特定の方法論に関する詳細な手引きではない。CFA システムを用いて首尾よく海水栄養塩を分析する方法をより詳細に記述している、Aminot and Kerouel (2007) および Aminot et al. (2009) と併せて活用されたい。

海水中の炭酸系パラメータの分析に対する Dickson et al. (2007) のアプローチに従い、特に推奨される「栄養塩標準操作手順 (NSOP)」 が付随されている。これらのいくつかは Dickson et al. (2007) の手順に忠実に基づいている。

また、航海中に収集される品質管理情報のメタデータ報告に関する勧告も用意した。栄養塩データを国内のあるいは国際的なデータセンターに報告するすべての機関はこれらに従うべきである。

後述するが、共通の海水栄養塩参照物質（RMNS: Reference Materials for Nutrients in Seawater）がすべての機関で使用されることを推奨する。全球の栄養塩データセットの比較可能性を向上させるために、必要なアプローチである。

1.2 海水の栄養塩参照物質（RMNS）の活用

今日まで海水中の栄養塩定量における国際的に認証された参照物質は出回っておらず、その結果として、データセット間に有意な相違があることが確認されている（たとえば Gouretski and Janke, 2001; Tanhua et al. 2009; Olafsson and Olsen, 2010）。信頼のおける RMNS 溶液を用いれば、データの品質と相互比較可能性は大いに向上するであろう。

2006 年、日本の気象研究所の青山道夫氏は、株式会社環境総合テクノス（“KANSO テクノス”としても知られる）の太田秀和氏と協同で、世界中の 55 機関による国際比較実験を実施した（Aoyama, 2007）。実験に使用した溶液は、ある範囲の栄養塩濃度をもつ天然海水で、高圧殺菌された後に、最高水準の清浄度の環境下でボトルに封入されたものを、KANSO テクノスが用意した。Aoyama(2007)は、この溶液が RMNS として使用できる程度に十分に安定で、濃度が変化しないことを示した。青山氏と太田氏の成功は、Alain Aminot と Don Kirkwood が ICES を通じて実施した一連の相互比較実験(たとえば Aminot and Kirkwood 1995)の教訓に基づいていた。

RMNS 溶液の普及により、確実に、機関内および機関間における測定の相互比較性は著しく高まる。分析機器を用いた最良手順や改善された内部標準法とともに、RMNS 溶液を活用すれば、栄養塩分析の相互比較性は 1%以上のレベルまで普通に到達するだろう。たとえば、一連の測定を通して「トラッキング（追跡）」用参照物質（3.3.3 節を参照）を用いれば、機関内における測定の正確さが向上するだけでなく、このアプローチは連続する一連の取り組みにも拡張できる。これまでこうしたアプローチはごくわずかな機関でしか行われていなかった。オランダ王立海洋調査研究所（RNIOZ）の van Ooijen 氏と Bakker 氏の仕事は、このアプローチの有効性をはっきりと立証した。

1.3 品質管理及び品質保証の定義

品質保証計画 quality assurance program は、二つの別個の関連する活動、すなわち、品質管理 quality control と品質評価 quality assessment からなる(Taylor, 1987)。

品質管理 ― とは、データの品質をユーザーの要求に適うように管理する活動の体系である。その目的は、生成されるデータが、規定された定量的な確率で示される、既知の正確さを持つことを保証することである。そしてその成果は信頼できるデータの供給である。

品質評価／保証 ― とは、品質管理が効果的になされていることを保証する活動の体系である。それは分析および分析システムのパフォーマンスの品質について連続的な評価を提供する。

品質管理の目的は、その出力が統計的に取り扱えるような安定した測定システムをもたらすこと、すなわち、「追跡可能な traceable」手順に従った「管理下にある in control」測定がなされることにある。測定に影響する手順のいかなる部分にも十分に配慮されなくてはならず、また、既知の品質データを取得するために必要な（そして実用的な）程度に、最善の状態を保ち（たとえば、天秤や分注器の校正）、安定化すべきである（たとえば、実験室の温度）。測定の品質は、管理方法（management practices）、分析者の訓練（personnel training）および技術的操作（technical operations）といった、三つの大きなカテゴリーに分かれる様々な要因に左右される(Taylor and Oppermann, 1986)。

品質管理で最初に求められるのは、手入れの行き届いた適切な装置と設備である。全ての技術的操作が信頼のおける首尾一貫した方法で実行されるよう、測定の手順は標準化され、文書化されるべきである。実験室をよく管理することや、個々の分析者に適切な訓練を施すこととは、高品質のデータを生むために肝要なことであるが（Taylor and Oppermann, 1986; Taylor, 1987; Vijverberg and Cofino, 1987; Dux, 1990 を参照）、こうした側面についてはここでは議論しない。

このような手順は Good Laboratory Practices (実験室での優良な取り組み；GLPs), Good Measurement Practices (測定における優良な取り組み；GMPs), Standard Operating Procedures (標準操作手順；SOPs)等の利用によって補完すべきである。GLPs と GMPs は、どちらも機関ごとに作成され、文書化されるべきものである。それらは、バラツキやバイアスの原因となる決定的な操作を特定し、それらの影響を最小化するのに役立つ。SOPs は特定の操作方法あるいは実行すべき分析手法を記述したものである。それらは個々の作業の実施方法に関する効率的な報告の基礎となりうる。

2、栄養塩分析とガス分画連続流れ方式の分析装置 (CFA; Continuous Flow Analysers) の利用

2.1 CFA の歴史覚え書き

1960 年代の後半、一日に数十から数百の試料を分析する必要に迫られた海洋科学者たちは、医療施設の先端的な装置を真似て自動的な化学測定を始めた。初期の進展は 1957 年に Skeggs が創り出した CFA システムの使用によりもたらされた(Skeggs, 2000; Atlas et al., 1971)。こうしたシステムはよく選ばれる海水の栄養塩分析手法となった(Mee, 1986; Aminot and Kerouel, 2007)。しかし、自動化された分析機器の使用増加に伴って、GEOSECS 以降、デー

タ品質が低下したことは明白であった(Gouretski and Jancke, 2001)。訓練が不十分で分析システムを「ブラックボックス」として取り扱う人たちがそれを使用すると、重大な系統的誤差が生まれかねない。したがって、高品質のデータを得るには、機器の使用と適切なメタデータの記録について、詳細かつ熟練に達したアプローチがとられることが不可欠である。

2.2 基礎 ― 比色法

20 世紀の前半を通じて、その当時に認識されていた海水中の栄養成分（窒素、リンおよびケイ素）を定量するための数々の手法が開発された。それらは色素の形成、すなわち、測定される海水中の特定の栄養物質の濃度に比例する発色の強さに基づいていた。それらの手法は人間の目による比色から分光光度計を用いた計測に進歩していった(Strickland and Parsons, 1972)。一般的で単純な手法の特質は、新たな“オートアナライザー”システムに容易に適用できることを意味していた(Atlas et al., 1971)。比色分析において鍵となるのは、発生した化学反応によって形成される色素の量は溶液中に存在する分析対象の量に比例する、という仮定である。理想的には両者の間には直線的な関係が得られる。「物理法則」のランベルト・ベールの法則がこの関係を記述する。溶液の吸光度は、形成された色素の濃度と測定セルの光路長に直接比例する（そしてまた、これは用いている分析法では海水中に含まれる分析対象の濃度に比例した色の強さが生じることを仮定している）。吸光度とは、溶液を透過した光の量を溶液に入射した光の量で割った値の対数をとって負号を付けたものである。これは分光光度計で測定できるものだが、CFA システムでは溶液を透過した光の量だけを測定する。初期のシステムにおいては、対数スケールのチャート紙上の記録を読み取り、吸光度を近似していた。AA-II タイプのシステム以降は、対数変換装置（ログアンプ）を用いて検出器のフォトセル出力を線型化している。

それゆえ、CFA 手法の利用においては、出力の正しい校正を決定する次の 3 つの要因がある ― (1) 反応条件は色素が分析対象の濃度に比例して形成されるものでなければならない、(2) 形成される色素の量はランベルト･ベールの法則が成り立たないレベルよりも低くなければならない、(3) 検出器の電子回路は出力信号を歪ませずに線型化しなくてはならない。

2.3 必要な手順

海水中の栄養塩濃度データを生みだす各々の段階において、注意を払わなくてはならない。本文書はこれらの段階の概要を紹介するものである。さらに、鍵となる段階については巻末に「栄養塩標準操作手順 (NSOP)」一式 を用意した。

2.4 試料の採取 (NSOP 7 参照)

海洋では栄養塩が幅広い濃度範囲で分布している。測定される濃度が採水時に現場で実際に存在している濃度であることを確かにするため、実際の濃度範囲全般にわたって注意を払わねばならない。極端に濃度が低い、貧栄養海域の表面水には、特段の注意が求められる。そうした試料は採取および保管を通じてコンタミを受けやすい。採水器や試料容器の内壁には、数時間から数日という短時間のうちに微生物の皮膜が付着する。そうした皮膜は栄養塩を取り込んだり放出したりする。栄養塩は生化学的反応と生体外(in vitro)反応により大きく変

動する。Gordon et al. (1993) は、亜硝酸塩とリン酸塩はもっとも不安定だが、ケイ酸塩はそれほど反応性に富んでいないようだと考えた。普通の保存条件下では、海水試料および標準溶液に含まれる亜硝酸塩の濃度は、ほんの 2-3 時間のうちに著しく変化する。しかし、ケイ酸塩の試料や標準溶液は、室温（暗所）で数日保管しても、ようやく検出できる程度しか変化しない。

2.4.1 採水器 (NSOP 7 を参照)

航海の初めと航海中には一週間の間隔で、採水器にコンタミや部品の損傷がないか、点検を実施すべきである。錆は除去し、損傷した部品は交換すべきである。微生物の皮膜も柔らかいスポンジと無リンの界面活性剤（Decon 90 など）を用いて除去すべきである（ブラシや研磨剤、たわしは採水器の表面を傷めて将来のコンタミの可能性を増大させるので使用してはいけない）。

2.4.2 採水手順と注意事項 (NSOP 7 を参照)

採水手順は重要である。

試料容器を 3 回すすぐ：試水を容器に全量の 1/3 程度入れ、緩く蓋をしてよく振り、すすいだ水を捨てる。その後で試水を容器に全量の 3/4 まで入れ（試水を凍結しなくてはならない場合、膨張するから）、しっかりと蓋をする。

採水中に指先（指紋）で栄養塩試料をコンタミさせないよう注意しなくてはならない。指紋は測定可能な量のリン酸塩を含んでいるためである。特に、石鹸で洗った手はリン酸塩のありふれたコンタミ源である。試水を導く採水コックの端や試料容器の内壁に手を触れてはいけない。タバコの煙も試水のコンタミを招くことが知られている。海水、雨水、ロゼットや採水器から滴り落ちる紛らわしい水の混入を避けること。

サンプリング中に手袋を着用する場合は、手袋がコンタミをもたらす可能性を検査しておくこと。航海を通じて異なる決定要素があるものの、この検査はコンタミの潜在的可能性を把握するために必要である。

2.4.3 試料容器 (NSOP 7 を参照)

栄養塩分析における最大のエラーは不適切な保存とともに、試料容器の不適切な選択によってもたらされる。船上にて採水器から採取した海水は、特にそれがサーモクライン以深であれば、ほぼ無菌状態の溶液である。したがって、試水を無菌状態ではない容器、たとえば、以前使用した容器で滅菌処理されていない容器に採水することは、大きな誤差要因となる。使い捨ての容器を使用し、その使用は一度かつ一度限りとすることが適切である。もし適切な無菌容器に試水を直接採取し、冷蔵庫内の暗所で保存すれば、試料は数日かそれ以上安定しうる。すべての試料容器について、コンタミの潜在的可能性を使用前に確認しておかなくてはならない。

2.4.4 試料の保存 (NSOP 7 を参照)

理想的には、栄養塩試料は生物的な成長や壊変の可能性を避けるために、採取後直ちに分析すべきである。試料がいつ測定されたかを、メタデータに記録することは重要である。この記録によって、長時間にわたって不適切に保存されたことからくるつじつまが合わないデ

ータを見分けることができる。

実際には、ブルームのピーク時でなければ、試料は数時間から数日にわたって保存可能かもしれない（冷暗所、冷蔵の条件下で）。ブルーム時の試料は、すぐにろ過することを勧める（ただし、アンモニウム測定や低濃度試料の場合はろ過せず、すぐに分析することを勧める）。「清潔は敬神に次ぐ美徳」という諺を忘れずに！

2－3 日よりも長く保存する必要がある場合、試料を採取後出来るだけ早く凍結させるべきである。凍結させる前には、試料が容器全量の 3/4 を超えておらず、固く蓋をされていることを確かめること。少なくとも-20℃以下の冷凍庫を用いること。冷凍する容器の周囲に空気がよく循環することが重要である。試料容器はラベルを付けた格子状の保管容器に入れ、測定するときに見つけやすく、選び出しやすいようにしておく。

凍結した試料は空気中で解凍すべきである。ウォーターバスは、バス内の水によるコンタミの恐れがあるので、用いるべきではない。試料が溶けて室温になじむにつれ、体積が小さくなって容器内圧が低下し、ウォーターバス内のコンタミした水を吸い込む可能性がある。

ケイ酸塩の定量に用いる試料は、重合の解消を待つために、少なくとも 24 時間、室温で放置すべきである(Macdonald et al., 1986; Zhang and Ortner, 1998)。40 μM kg^{-1} を超える高濃度試料を扱う場合は、凍結・解凍の手順が適切であるか確認すること。

2.5 分析装置の立ち上げ：鍵となる構成、その機能および気に留めておくべきこと

2.5.1 CFA のハードウェア

海水分析における CFA システムや使用上の実用的なガイダンスについては、より充実した情報が記載された Aminot and Kerouel (2007)および Aminot et al (2009)を参考にされたい。

CFA の一般的な構成を第 1 図に示す。

CFA システムでは、多チャンネルのペリスタルティックポンプを用いて、試料と発色試薬を連続的な液流中に送る。試料を含む液流は空気（または窒素）の泡で分画されることで、隣接したセグメント間の混合を防ぐとともに(Zhang, 1997)、液流中での試料と試薬の混合が促進される。分画された液流はシステムのマニフォールド―各成分の分析法に応じた混合と遅延を実現する一連のガラスコイル―を通過する。試料と試薬が混合して化学的に反応すると、試料中の栄養塩濃度に比例した吸光度をもつ、色のある化合物が形成される。最終的に、流路の末端にあるフロースルー式の比色計を用いて、発色した溶液の光の透過量が測定される。比色法ではなく発光法（蛍光法）が用いられることもあり、その場合は発光（蛍光）光度計の出力が分析対象の濃度に直接比例する。

手分析と CFA 法の根本的な違いは、CFA では発色の完了が要求されない点にある。CFA では、すべての標準溶液と試料は発色試薬の中に同じ時間に一定の比率で送り込まれるので、発色の達成度が揃っているはずだからである。しかしながら、この特徴によって、発色率のばらつきをもたらすあらゆる要因（たとえば、実験室の室温、試料の塩分、ポンプの流量変動、混合の効果や試薬の比率に影響する分画の長さのばらつき）から誤差がもたらされる。こうした理由から、高精度分析では、可能な限り発色反応の完了に近い状態に調整される。

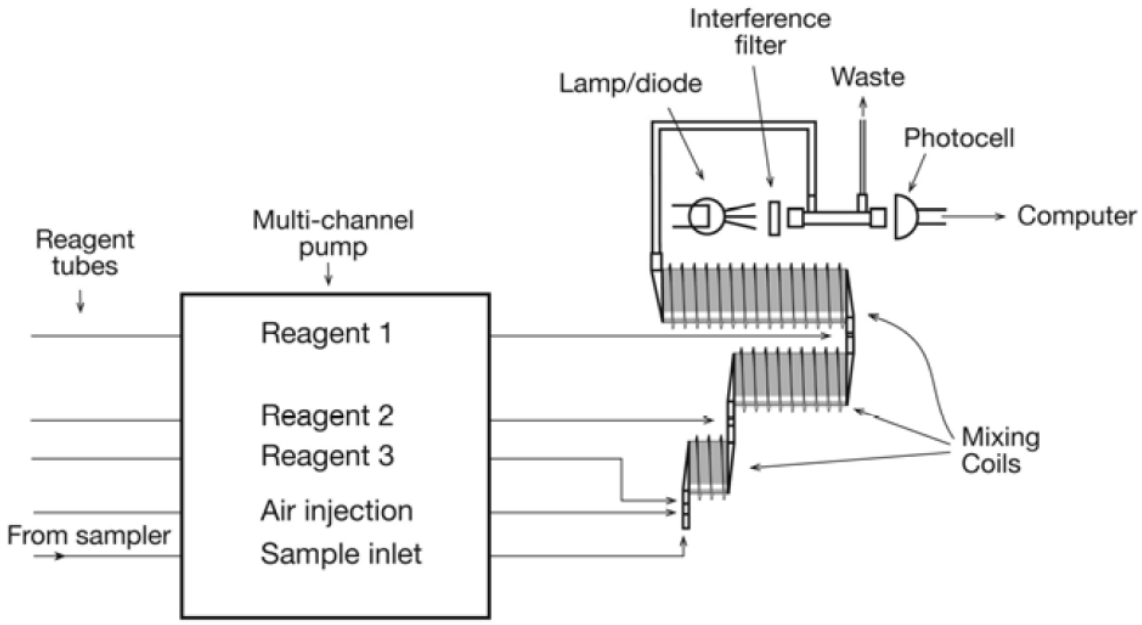

Figure 1. Schematic of a CFA system

第 1 図 CFA システムの概念図

サンプラー : CFA システムは自動化されたサンプラーから始まる。吸引ニードルが試料容器と洗浄液との間をあらかじめ決められた時間間隔で行き来する。サンプラーは船上でも信頼できる動作が止まらない、安定した性能が出せるように頑丈でなくてはならない。洗浄液は測定の始めと終わりのベースラインとなるとともに、各試料を分離し、特定できるよう、間を区切るマーカーの役目も果たす。なお、試料間のベースラインの測定に、必ずしも洗浄液を用いる必要はない。

ペリスタルティックポンプ（チューブポンプ・ローラーポンプ）：ペリスタルティックポンプは CFA システムの心臓部であり、試料、試薬、空気（または窒素）の泡を同時にシステム内に送り出す。ペリスタルティックポンプが高品質であれば、それだけ分析の精度も良好になる。ポンプに用いるチューブは異なる内径を持っているが(異なる流量をもたらすため)、内壁の厚さは同じになっている（流量の異なるチューブを隣り合わせでポンプに設置できるように）。製品のチューブ内径は種類ごとに異なっており、チューブ交換で分析の見かけの感度を 2-3%ずつ変えられるようになっている。長時間のチューブ使用で劣化したり、伸ばされたり、また測定中に温まると、同じ理由で見かけの感度の上昇または低下が発生する。各チューブから送られる液量変化が、試料と試薬の比率変化をもたらすためである。したがって、そのような分析感度の上昇または低下を後から特定できるようにするため、ポンプに使用するすべてのチューブ交換について記録しておく必要がある（メタデータ報告に関する NSOP 12 を参照）。

反応マニフォールド : それぞれの分析法にひとつずつ、適切に選択されたインジェクションフィッティング、らせん状のガラス製混合コイル、ヒーティングバス等を用いてマニフォールド（あるいはカートリッジ）を組み立てる。鍵を握る構成部品は空気を注入するインジェクションシステムである（製品によってばらつきがある）。これらは適切な大きさの気泡

が適切な間隔で整然と注入され、理想的にはらせん状ガラスコイルの１ループにつき３つの気泡が入るよう、入念にメンテナンスされなければならない。

比色計：マニフォールドからの化学反応で発色した溶液は比色計を通る。標準的な AA-II (Technicon)タイプのシステムでは、光源はフィラメント式の電球で、分析波長は適切な干渉フィルタを光が通過することで得られる。流れが検知セルに入る前に、デバブラを用いて気泡を除去する。それまで分画されていたセグメントはこの時点から混合し始める。検知セルは、光源とフォトダイオード（あるいはより新しいシステムではフォトチューブ）の検知器を備えたガラス管である。溶液はガラス管の屈曲部を通って光路に導入され排出される。このことは検知セルが光学的に完全でなく、屈折により光路の歪みが生じうることを意味している(Froelich and Pilson, 1978; Dias et al., 2006)。もし洗浄液と試料の密度が異なると、両者が混合して形成される密度勾配によって光が屈折し、各ピークの始まりと終わりの部分に見かけのシグナルが作られる。新しいシステムはより良い光学系を備える傾向にあり、フローセルへの気泡通過が許されるものもある。気泡からのノイズは、気泡の入るタイミングに合わせて光源をコントロールしたり、気泡の信号を検知し、電気的に処理することで除去される。

2.5.2 アセンブリとメンテナンス

満足できる結果を得るためには、システムの構成部品をいくつかの考えを念頭において配置しなくてはならない。

(1) サンプラー～ポンプ、ポンプ～マニフォールド等の流路は最短にすること。特に、試料を吸入するニードル～ポンプなど液流が気泡で分画されていない箇所が該当する。分画されないままの流れが長くなると、試料と洗浄液とが過剰に混合する可能性がある。

(2) 試薬用のポンプチューブに接続するトランスミッションチューブは、その径がポンプチューブと同じか、30%程度細いものにすべきである。気泡分画された液流を運ぶトランスミッションチューブも、その径がガラス製のマニフォールド部品と同じか、30%程度細いものにすべきである。このことは、比色計から気泡を排出するラインにも当てはまる（規則的な気泡のパターンが排液ライン中で保たれるため）。チューブの径に対する体積の比が増大すると、ポンピングの抵抗が大きくなり、流れにサージング（うねり）（宮尾注：脈流的な動き、極端なケースでは瞬間的な逆流）が発生することがある。これはノイズの原因となる。

(3) すべての構成部品は流れに沿った圧力傾度を作らないように配置しなくてはならない。圧力傾度があると流れにサージングが発生する傾向がある。試薬容器を CFA よりも高い棚に置いたり、床に置いた排液容器まで細い径の排液チューブで直接排出するのはよくない。

(4) 流路の内部に「デッド・ボリューム dead volumes」を作らないようにする。デッド・ボリュームはデバブラやガラス製部品の接続部のすき間で生じやすい。

(5) 規則正しい気泡のパターンは、ノイズのない出力信号を得るための必須条件である。良い気泡のパターンは、システムが清浄であることと、検知器からの排出ラインも含め、気泡が通過するプラスチック製チューブ内がすべて確実にぬれた状態であることに依存する。良い状態の気泡は前後が丸みを帯びているが、ぬれていない状態では気

泡の後ろ側に丸みがない。日々の作業の最後に、試薬とマニフォールドのラインを純水で洗い、続いて Decon 90 などのリン酸塩を含まない洗剤で洗い、再び純水で洗浄する。

2.6 試薬の準備

2.6.1 試薬の仕様

特級試薬を用いることにより、試薬の純度に起因する問題を最小化できる。CFA システムでは、試薬に含まれる少量のコンタミはベースラインに一定のオフセットをもたらすものの、試料にも標準溶液にも等しく影響するので許容される。しかし試薬のコンタミによって大きな吸光度が生じ、全体の吸光度が非線型となるレンジまで押し上げられると問題である。試薬の水に対する吸光度は、定期的に測定されるべきである。一般に、試薬の吸光度が高いほど分析の検出限界も高くなってしまう。

乗船前に秤量し、包装した粉末・粒状試薬を船上の分析で使用するときは、いつ秤量したものか分かるようにラベルを付け、試薬のバッチを特定できるようにする。また、ラベルに対応する秤量元試薬の製造元やロットを控えておく。試薬を溶液に調製する時は、いつ、どのバッチの試薬を使用したかを記録するとともに、使用開始の日時を記録すると良い。そうした情報は、試薬の「不良バッチ」や、試薬の調製や秤量が不適切であったことから生じる問題の原因追跡に極めて貴重な情報となる。

2.6.2 試薬の容器とメンテナンス

試薬の容器は使いやすく、簡単に洗浄できるものがよい。ガラス製容器の使用は、溶出によるケイ素のコンタミを避けるため、最小限にすべきである(Zhang et al., 1999)。水道水は高レベルのケイ素と硝酸を含んでいるため、絶対に使用してはならない。洗浄には潤沢に使える純水を用いればよく、必要に応じて Decon 90 を用いる。容器を清浄にしたら、シールしてきれいに保つが（簡単に言えば、ふたを元どおりに締める）、必ずしも乾かす必要はない。大気由来のアンモニアによるコンタミが問題となるラボもある。よく管理された容器で保存された試薬は、汚れた容器に保存されたものよりも劣化が進みにくいので、保存容器を定期的に洗浄することで、分析結果の変動を低減できる。溶液を移し替えるとき、容器の外側にこぼれたものは全てきれいに拭き去ること。容器を清浄な状態を保てないことから生じる最悪の事態は、瓶の首にモリブデンブルーを沈着させてしまうことである。このコンタミが試薬溶液に入ると、自己触媒反応で溶液全体が青くなる。酸化されたモリブデン酸試薬をケイ素測定に用いると、時間がたつにつれて白い沈着物を生じる。船上でも、溶液を定期的に入れ替える際に、モリブデン試薬の容器を純水で洗うことにより、簡単に防ぐことができる。容器に沈着物が生じた場合には、Decon 90 の 10%溶液で溶解させることができる。

2.6.3 純水

栄養塩分析には信頼のおける純水が必須である。蒸留水は（ガラス製蒸留器からの）ケイ素や、蒸留中に大気から吸収される窒素化合物（アンモニウムおよび窒素酸化物）のコンタミがあるので使用すべきではない。可能な場所では、脱イオン後に逆浸透圧にかけた水を用いるのが望ましい。そうしたシステムは、調査船でもごく普通に使われている。理想的には

比抵抗が 18MΩcm の水が望ましい。蒸留について述べたように、船内の大気からアンモニウムや窒素酸化物を吸収する可能性があるので、純水はできるならば保存しておかない方がよい。同様に、ケイ素のコンタミを防ぐためにガラス容器も避けるべきである(Zhang et al, 1999)。注意：超音波で脱気処理した純水は、溶解している窒素ガスから亜硝酸塩が発生する可能性がある。

2.6.4 洗浄液とブランク溶液

どのような CFA システムでも、検知セルの中に密度の異なる溶液が入ると見かけの信号が発生する傾向がある。したがって、洗浄液は、測定しようとする海水試料と同じような光学的密度のマトリックス（共存塩）でなくてはならない。

洗浄液は、通常、校正用標準溶液の調製にも用いられる。CFA システムでは発色した溶液が検知セルを通過するとき、化学反応が完全には終了していない可能性がある。試料のマトリックスは発色反応速度に影響を及ぼしうるため、もし洗浄液と試料の化学組成が著しく異なれば、各々で見かけの分析感度が違ってくるかも知れない。したがって、標準溶液を純水、海水、塩化ナトリウム溶液で調製する場合は、用いる分析法の見かけの感度が変わるかどうか、必ず確認しなくてはならない。

2.6.5 ブランクと洗浄液の選択

校正用標準溶液の調製に使用する理想的な洗浄液とマトリックスは、測定する試料に近い塩分をもち、分析対象の栄養塩を検出限界未満または低い濃度しか含まない天然海水（LNSW；low nutrient seawater）である。一部の機関では、幸運なことに、低栄養塩濃度の天然海水を大量に採取し、保存して、有効利用することができるため、洗浄液にもワーキング・スタンダードの調製にも LNSW が使用されている。LNSW は採取後、孔径 1μm 以下のフィルタでろ過し、暗所で数ヶ月保管して安定させてから使用するが、使用前には、航海中の分析法よりも高感度な手法で栄養塩濃度をチェックしておくことが望ましい。

塩化ナトリウムの 40 g l^{-1} 溶液は、塩分 35 の海水と同じ屈折率で、大半の分析法において反応速度に海水と著しい違いがないため、洗浄液や標準溶液を調製するための人工海水（ASW; artificial seawater）として、よい結果が得られている。LNSW や ASW を洗浄液として用いれば、事実上の「ゼロ」標準となるため、これらの栄養塩濃度に関する品質の監視には細心の注意を払わなくてはならない。実際の品質監視方法については、NSOP 10 に記述されている。ASW を塩化ナトリウムから作る際には、各バッチの塩化ナトリウムをチェックする必要がある。PO_4 と NO_3 のコンタミはまれにしか起こらないが、Si のコンタミは一般的に起こりやすい。Si のコンタミの程度は数 μM kg-1 にも達することがあり、そのバッチの塩化ナトリウムは使わないようにする。

フローセルの光学系が改良された新しい装置の出現に伴い、多くの機関でベースライン洗浄液に純水が用いられている(Aminot et al. 2009)。その場合には、純水の測定値を試料の濃度計算には使用せず、別途、LNSW や ASW の測定値を「ゼロ」標準として用いる。

7、謝辞

2007 年 11 月、日本の気象研究所の青山道夫氏は、海水中の栄養塩測定における国際的な比較可能性を向上させるプロセスの一環として、「国際栄養塩スケールシステム（INSS）」の確立を議論する会議をつくばで開催した。この会議の開催は、海水中の栄養塩測定を行うすべての機関が使用できる、海水ベースの参照溶液の発展における礎となるだろう。会議ではまた、新しい海水ベースの参照溶液が使用されたとしても、その機関で最良の方法（best practice）に従った測定がなされなければ、相互比較可能性のより高いレベルへの向上が阻害されるであろうことが認識された。そのため、WOCE 各層観測プログラムをサポートするために作成された、Gordon et al（1993）のプロトコル更新に取り組むことが合意された。

本文書は、Lou Gordon 氏の優れた仕事と彼がもたらしたプロトコル “A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients (Phosphate, Nitrate, Nitrite and Silicic Acid) in the WOCE Hydrographic Program and the Joint Global Ocean Fluxes Study by Louis I. Gordon, Joe C. Jennings, Jr. Andrew A. Ross, James M. Krest (1993) WOCE Hydrographic Program Office, Methods Manual WHPO 91-1”を出発点とし、最良の方法とは何かを説明し、例証することを目的として作成された。

新しく作成された文書のフォーマットは、標準操作手順書（SOP）が付随された Dickson et al. (2007) [Dickson, A.G., Sabine, C.L. and Christian, J.R. (Eds.) 2007. Guide to best practices for ocean CO2 measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.]を受け継いでいる。栄養塩標準操作手順書（NSOP）の作成にあたり、アンドリュー･ディクソン氏から炭酸系の SOP オリジナルファイルを快く提供いただいたため、NSOP のいくつかは、Dickson et al. (2007)の内容を厳密に受け継いでいる。

8、引用文献

Aminot, A. and D. S. Kirkwood. 1995. Report on the results of the fifth ICES Inter-comparison study for Nutrients in Seawater. ICES Cooperative Research Report No. 213, 79 pp.

Aminot, A. and R. Kerouel. 1995. Reference material for nutrients in seawater: stability of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate in autoclaved samples. Mar. Chem. 49, 221–232.

Aminot, A. and R. Kerouel. 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines methodes en flux continu. 188p. In Methodes d’analyse en milieu marin. Ifremer, ed. Editions 25, Quae ISBN 978-2-7592-0023-8.

Aminot, A., R. Kerouel and S Coverly. 2009. Nutrients in Seawater Using Segmented Flow Analysis. Pp. 143-178, Chapter 8 in Practical Guidelines for the Analysis of Seawater. Oliver Wurl, ed. CRC 2009 408pp ISBN-13: 978-1420073065.

Aoyama, M., J. Hamanaka, A. Kudo, Y. Otsubo, K.Sato, A. Yasuda, and S. Yokogawa. 2005. Nutrients, Pp. 57-73 in WHP P6, A10, I3/I4 Revisit Data Book - Blue Earth Global Expedition 2003 (BEAGLE2003) – Volume 2, Hiroshi Uchida and Masao Fukasawa, eds., JAMSTEC, Yokosuka.

Aoyama, M., S. Becker, M. Dai, H. Daimon, L. I. Gordon, H. Kasai, R. Kerouel, N. Kress, D. Masten, A. Murata, N. Nagai, H. Ogawa, H. Ota, H. Saito, K. Saito, T. Shimizu, H. Takano, A. Tsuda, K. Yokouchi and

A. Youenou. 2007. Recent comparability of Oceanographic Nutrients Data: Results of a 2003 Intercomparison Exercise using Reference Materials. Analytical Science 23, 1151-1154.

Aoyama, M., J. Barwell-Clarke, S. Becker, M. Blum, Braga E. S., S. C. Coverly, E. Czobik, I. Dahllof, M. H. Dai, G. O. Donnell, C. Engelke, G. C. Gong, Gi-Hoon Hong, D. J. Hydes, M. M. Jin, H. Kasai, R. Kerouel, Y. Kiyomono, M. Knockaert, N. Kress, K. A. Krogslund, M. Kumagai, S. Leterme, Yarong Li, S. Masuda, T. Miyao, T. Moutin, A. Murata, N. Nagai, G. Nausch, M. K. Ngirchechol, A. Nybakk, H. Ogawa, J. van Ooijen, H. Ota, J. M. Pan, C. Payne, O. PierreDuplessix, M. Pujo-Pay, T. Raabe, K. Saito, K. Sato, C. Schmidt, M. Schuett, T. M. Shammon, J. Sun, T. Tanhua, L. White, E.M.S. Woodward, P. Worsfold, P. Yeats, T. Yoshimura, A.Youenou and J. Z. Zhang. 2008. 2006 Inter-laboratory Comparison Study of a Reference Material for Nutrients in Seawater. Technical Reports of the Meteorological Research Institute 58, 104 pp., Tsukuba, Japan.

Aoyama, M. C.and co-authors. 2010. 2008 Inter-laboratory Comparison Study of a Reference Material for Nutrients in Seawater. Technical Reports of the Meteorological Research Institute 60, 134 pp., Tsukuba, Japan.

Atlas, E. L., S. W. Hager, L. I. Gordon and P. K. Park. 1971. A practical manual for use of the Technicon Autoanalyser in seawater nutrient analyses; Revised. Technical Report 215. Oregon State University, Dept of Oceanography, Ref. No. 71-22. 48 pp.

Dias A.C., E.P. Borges, E.A. Zagatto, and P.J. Worsfold. 2006. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. Talanta 68,1076-1082. Dickson, A.G., C.L. Sabine, and J.R. Christian, eds. 2007. Guide to best practices for ocean CO2 measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.

Dux, J.P., (1990). Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory, 2nd edn. Van Nostrand Reinhold, New York, 203 pp.

Froelich P.N. and M.E.Q. Pilson 1978. Systematic absorbance errors with Technicon Autoanalyser II colorimeters. Water Res. 12, 599-603. 26

Gordon, L.I., J.C. Jennings, A.A. Ross, and J.M. Krest. 1993. A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients (Phosphate, Nitrate, Nitrite and Silicic Acid). In The WOCE Hydrographic Program and the Joint Global Ocean Fluxes Study , WOCE Hydrographic Program Office, Methods Manual WHPO 91-1.

Gouretski V.V. and K. Jancke. 2001. Systematic errors as the cause for an apparent deep water property variability: global analysis of the WOCE and historical hydrographic data. Progress in Oceanography 48, 337–402.

Lembeck, J. 1974. The Calibration of Small Volumetric Laboratory Glassware. NBSIR 74-461. Available online at: http://ts.nist.gov/MeasurementServices/Calibrations/upload/74-461.PDF.

MacDonald, R.W., F.A. McLaughlin and C.S. Wong. 1986. Storage of reactive silicate samples by freezing. Limnol.Oceanogr. 31: 1139-1142.

Mee, L.D. 1986. Continuous flow analysis in chemical oceanography: Principles, applications and perspectives. Sci. Total Environ. 49, 27-87.

Mostert, S.A.. 1988. Notes on improvements and modifications to the automatic methods for determining dissolved micronutrients in seawater. S. Afr. J. Mar. Sci. 7, 295-298.

Olafsson, J. and A. Olsen. 2010. Nordic Seas nutrients data in CARINA. Earth Syst. Sci. Data Discuss., 3, 55-78.

Skeggs L.T. Jr. 2000. Persistence and Prayer: From the Artificial Kidney to the AutoAnalyzer. Clinical Chemistry 46, 1425-1436.

Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of sea-water analysis (2nd Edition). J. Fish. Res. Bd. Canada. 167, 311 pp.

Tanhua, T., P. J. Brown, and R. M. Key. 2009. CARINA: nutrient data in the Atlantic Ocean. Earth Syst. Sci. Data 1, 7-24.

Taylor, J.K. and H.V. Oppermann. 1986. Handbook for the quality assurance of metrological measurements. National Bureau of Standards. NBS Handbook 145.

Vijverberg F. A. J. M. and W. P. Cofino. 1987. Control procedures: good laboratory practice and quality assurance. ICES Techniques in Marine Science No. 6.

Zhang, J.-Z. 1997. Distinction and quantification of carryover and sample interaction in gas segmented continuous flow analysis. Journal of Automatic Chemistry Vol. 19, No.6, 205-212.

Zhang, J.-Z. and P. B. Ortner. 1998. Effect of thawing conditions on the recovery of reactive silicic acid from frozen natural water samples. Water Research 32, 2553-2555.

Zhang, J.-Z., C. Fischer and P. B. Ortner. 1999. Dissolution of silicate from glassware as a contaminant in silicate analysis of natural water samples. Water Research 33, 2879-2883.

DUMMY

微量金属

○小畑　元（東京大学大気海洋研究所）

海水中の微量金属元素を測定する場合、外部からの汚染を最も受けやすいのは採水作業時である。このため、採水作業時には細心の注意が必要である。採水において注意すべき点については、Vol. 2, Chap. 1, 「4.クリーン採水」に記述したので、参照されたい。

1、海水の濾過

溶存態の微量金属元素を測定項目とする場合、濾過の操作が必要となる。金属元素の場合，溶存態と比べて，粒子態の存在度が無視できないケースが多いからである。しかし、濾過操作中にしばしば海水試料は汚染されてしまう。濾紙(フィルター)、濾過器の材質・洗浄方法に十分に気をつける必要がある。例えば孔径 0.2μm や 0.4μm のヌクレポアフィルターは微量金属用海水の濾過によく使われるが、希釈した高純度の酸によって洗浄して使用しなければならない。一方、酸がフィルターに残っていると汚染の原因となる。フィルターから完全に酸を洗い落とさなければならない。濾過に用いる濾過器にはテフロン製、ポリカーボネイト製のものがよく使われる。これらの濾過器も材質に応じた洗浄法を選択する必要がある。

国際 GEOTRACES 計画ではカプセルフィルターの利用も認められている。例えば日本 GEOTRACES のグループは Acropak(PALL)という孔径 0.2μm のポリサルフォン系のフィルターをよく用いている。0.1M 程度の希釈した高純度塩酸で一日満たし、その後、超純水を大量に流して酸を洗い落とす。超純水で満たした状態で 1 日以上置いておくと良い。実際の観測では同じカプセルフィルターをいくつかの観測点で利用することが多い。長期にわたる観測では、次の観測で使用するまでの間にカプセルフィルター内で微生物が繁殖するのを防ぐため、カプセルフィルターは冷蔵庫に入れて保管するなどの取り扱いも必要になる。

2、船上分析法

海水中で存在状態が変化してしまう微量元素については、船上で測定することが望ましい。また、試料採取時に汚染を受けやすい元素については船上で速やかに測定することが推奨される。サンプリング時に汚染された試料を持ち帰ってしまっては、折角採取した試料でも意味が無くなってしまうからである。国際 GEOTRACES 計画では、汚染を受けやすい鉄や亜鉛などを船上分析法で測定しておくことが推奨されている。これらの元素は船上分析中にも汚染を受けやすいことから、フロー系などを使って自動化された分析法を適用することが望ましい。様々な分析法が適用可能であるため、ここでは、海水中の鉄、亜鉛、アルミニウムについての文献をいくつか挙げておく(アルミニウム: Brown & Bruland, 2008, 鉄: Lohan et al., 2006; Measures et al., 1995; Obata et al., 1993, 亜鉛: Gosnell et al., 2012; Jakuba et al., 2008; Lohan et al., 2003;)。

3、保存・前処理

船上分析できない元素については、試料を持ち帰って分析する必要がある。特に、測定に大型装置を必要とする元素の場合、最初に試料の保存法を確立しておくことが重要である。

微量金属元素は中性からアルカリ性の海水中では保存容器の壁面に吸着することが多い。海水中の微量金属元素の総濃度を測定するためには、海水に高純度の酸を添加し、pH を 2 以下にして容器への吸着を防ぐ。ただし、添加する酸に含まれている不純物が汚染の原因になりうるため、事前に酸の中の不純物濃度もチェックしておくべきである。添加する酸については、塩酸・硝酸がよく用いられる。対象とする元素に対して、最適な酸を添加する。試料を長期保存する場合は、保存容器からの金属元素の溶出もあらかじめ検討しておく必要がある。保存容器の材質、洗浄法を検討することにより、長期の保存が可能となる。容器として、低密度ポリエチレン瓶やテフロン瓶は比較的金属の溶出が少ないと考えられている。樹脂製の容器でも触媒に金属が使われている場合があり、対象とする元素によって適した材質は異なる。事前の検討が必要である。

一方、酸を添加し、pH を下げることによって海水中の元素の存在状態は変化してしまう。しかし、冷凍することによって海水試料中の微量元素の存在状態を一時的に保存できる場合がある。例えば海水中のヨウ素は主に IO_3^- と I^- として存在することが知られているが、冷凍することにより数年は試料として保存できるとも言われている。このような場合にも事前にチェックして、どの程度の期間、保存が可能か調べておくことが望まれる。

4、陸上での分析法

微量金属元素を低濃度まで測定できる様々な方法が開発されているが、現在では、多元素を同時に高感度で測定可能な誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)が最も良く用いられている。原理としては、高周波電流を流したコイルにより、アルゴン気流をプラズマ状態にする。ここに測定対象元素を含む溶液をネブライザーにより噴霧し、アルゴンプラズマに導入する。プラズマ中で原子化・イオン化された元素は高真空状態の質量分析部に送られ、エネルギー分析・質量分析により測定される。質量分析部は四重極型または二重収束型を使用している場合があり、測定しやすい元素や感度はそれぞれ異なっている。

海水には多量の塩が含まれているため、海水中の微量金属元素を ICP-MS で直接測定するのは困難である。測定対象元素をあらかじめ多量の塩から分離しておく必要がある。水酸化マグネシウム共同沈殿法、キレート樹脂濃縮法などが適用可能であり、様々な方法が開発されている。分離濃縮の操作中に外部からの汚染を受ける可能性もあることから、作業をクリーンな環境下で行うことやフロー系を用いることなどが求められる。また、同位体濃縮スパイクを添加してその同位体比を測定する同位体希釈法を用いる場合もあり、高精度な分析が必要になる場合には利用する。対象となる元素や測定精度に応じて方法を選ぶ必要がある。

現在ではキレート樹脂カラムによる前濃縮の後、ICP-MS によって測定する方法が数多く開発されている。その中で、よく使われている分析法をいくつか表に挙げた。これらの方法を利用するためには、分析者に技術と経験が必要となる。汚染なく対象元素を測定するために、濃縮操作によるブランク値が海水と比べて十分低いこと、標準海水などを測定して参考値と一致することなどを確認しておくことも重要である。技術習得と客観的評価を通じて、確からしい値を提出していく姿勢が必要となる。

表．キレート樹脂前濃縮法およびICP-MSを用いた海水中の微量金属元素分析法

References		Sohrin et al. (2008)	Milne et al. (2010)	Lee et al. (2011)	Biller and Bruland (2012)	Lagerstrom et al. (2013)	Minami et al. (2015)
Elements		Al, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	Fe, Cu, Cd, Pb	Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn	Al, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb
Resin		Nobias-chelate PA1	Toyopearl Chelate-650 IDA resin	NTA Superflow	Nobias-chelate PA1	Nobias-chelate PA1	Nobias-chelate PA1
ICP-MS		Quadrupole	Magnetic Sector	Quadrupole	Magnetic Sector	Magnetic Sector	Magnetic Sector
					Automatic	Automatic	Automatic
Detection Limit (nM)							
	Fe	0.036	0.021	0.07	0.014	0.014	0.09
	Cu	0.005	0.007	0.12	0.052	0.003	0.02
	Pb	0.001	0.0002	0.0005	0.00056	-	0.0009
	Mn	0.01	0.007	-	0.002	0.002	0.003
	Zn	0.06	0.005	-	0.03	0.016	0.1

5、標準海水試料

海水中の微量金属元素を正確に測定するためには、分析法の精度、確度をチェックしておく必要がある。実際のサンプルと同程度の濃度を持ち、対象元素について保証値(Certified value)が分かっている標準海水を分析することが望ましい。市販の標準海水試料としては、National Research Council Canada の標準海水(NASS-6 など)を購入することができる。しかし、実際の外洋海水と比べると濃度がやや高いため、国際 GEOTRACES 計画のような厳密さを求められる場合は利用されていない。国際 GEOTRACES 計画に関わるパラメーターについては、参考値のついた標準海水試料(SAFe, GEOTRACES など)が配布されており、利用可能となっている(詳細は web site を参照: http://es.ucsc.edu/~kbruland/GeotracesSaFe/kwbGeotracesSaFe.html)。ただし、ストックされている海水量が少ないため、永続的に入手することはできない。標準海水試料を大量に長期間、品質を変化させることなく保存するのは難しい。今後も様々な試みが行われていくと考えられる。

引用文献

Biller, D. V., and K. W. Bruland (2012): Analysis of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in seawater using the Nobias-chelate PA1 resin and magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Mar. Chem., 130-131, 12–20.

Brown, M.T. and K. W. Bruland (2008): An improved flow-injection analysis method for the determination of dissolved aluminium in seawater. Limnol. Oceanogr.: Methods, 6, 87-95.

Gosnell, K.J., W. M. Landing, A. Milne (2012): Fluorometric detection of total dissolved zinc in the southern Indian Ocean. Mar. Chem., 132-133: 68-76.

Jakuba, R.W., J. W. Moffett, and M. A. Saito (2008): Use of a modified, high-sensitivity, anodic stripping voltammetry method for determination of zinc speciation in the North Atlantic Ocean. Anal. Chim. Acta, 614, 143-152.

Lagerström, M. E., M.P. Field, M. Séguret, L. Fischer, S. Hann, R.M. Sherrell (2013): Automated on-line flow-injection ICP-MS determination of trace metals (Mn, Fe, Co, Ni, Cu and Zn) in open ocean seawater: Application to the GEOTRACES program. Mar. Chem., 155, 71–80.

Lee, J.M., E. A. Boyle, Y. Echegoyen-Sanz, J. N. Fitzsimmons, R. Zhang, R. A. Kayser, (2011): Analysis of trace metals (Cu, Cd, Pb, and Fe) in seawater using single batch nitrilotriacetate resin extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 686, 93–101.

Lohan, M. C, D. W. Crawford, D. A. Purdie, P. J. Statham (2003): Iron and zinc enrichments in the northeastern subarctic Pacific: Ligand production and zinc availability in response to phytoplankton growth. Limnol. Oceanogr., 50, 1427-1437.

Lohan, M.C., A. M. Aguilar-Islas, K. W. Bruland (2006): Direct determination of iron in acidified (pH 1.7) seawater samples by flow injection analysis with catalytic spectrophotometric detection: Application and intercomparison. Limnol. Oceanogr.: Methods, 4, 164-171.

Measures, C. I., J. Yuan, J. A. Resing (2005): Determination of iron in seawater by flow injection analysis using in-line preconcentration and spectrophotometric detection. Mar. Chem., 50, 3-12.

Milne, A., W. Landing, M. Bizimis, P. Morton (2010): Determination of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in seawater using high resolution magnetic sector inductively coupled mass spectrometry (HR-ICP-MS). Anal. Chim. Acta 665, 200–207.

Minami, T., W. Konagaya, L. Zheng, S. Takano, M. Sasaki, R. Murata, Y. Nakaguchi, Y. Sohrin (2015): An off-line automated preconcentration system with ethylenediaminetriacetate chelating resin for the determination of trace metals in seawater by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 854,183–190.

Obata, H., H. Karatani, E. Nakayama (1993): Automated determination of iron in seawater by chelating resin concentration and chemiluminescence detection. Anal. Chem., 65, 1524-1528.

Sohrin, Y., S. Urushihara, S. Nakatsuka, T. Kono, E. Higo, T. Minami, K. Norisuye, S. Umetani (2008): Multielemental determination of GEOTRACES key trace metals in seawater by ICPMS after preconcentration using an ethylenediaminetriacetic acid chelating resin. Anal. Chem., 80, 6267–6273.

DIC

炭酸系に関する第 4 章DIC，第 6 章pH，第 7 章pCO2については、CDIAC の下記 web サイトのそれぞれに該当する SOP の日本語訳が掲載されている。

http://cdiac.ornl.gov/oceans/Handbook_2007.html

DUMMY

全アルカリ度　（分光光度法）

○石井　雅男，小杉　如央（気象研究所）

1、はじめに

ここでは、分光光度法による海水中の全アルカリ度の定量について述べる。電位差滴定法による全アルカリ度の定量については、Dickson, A.G., Sabine, C.L. and Christian, J.R. (Eds.) 2007, “Guide to best practices for ocean CO_2 measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.“ (http://cdiac.ornl.gov/oceans/Handbook_2007.html) の第 4 章　SOP 3a と SOP 3b　に述べられているので、そちらを参照願いたい。ここで紹介する方法は、外洋域の全アルカリ度(2000-2500 μmol kg^{-1})の精確な定量に適した方法である。

2、全アルカリ度とは

海水の全アルカリ度(A_T)は、「海水 1 kg 中のプロトン受容体（イオン強度 0、水温 25℃において解離定数が $K \leq 10^{-4.5}$ の弱酸から形成される塩基）の、プロトン供与体($K > 10^{-4.5}$ の酸)に対する過剰量と等価な水素イオンのモル数」と定義され、式(1)で表すことができる。

$$\begin{aligned} A_T = {} & [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] + [HPO_4^{2-}] \\ & + 2[PO_4^{3-}] + [SiO(OH)_3^-] + [NH_3] + [HS^-] + \cdots \\ & - [H^+]_F - [HSO_4^-] - [HF] - [H_3PO_4] - \cdots \end{aligned} \quad (1)$$

[ ]は、それぞれの溶存化学種の濃度を表し、$[H^+]_F$ は水分子と水素結合してそれ以外のプロトン受容体とは結合していない水素イオンの濃度を表す。省略符号… は、実体が分からないか無視できるほど濃度が低いその他の酸や塩基の濃度を表す。

3、測定の原理

既知量の海水サンプルをビーカーなどの容器に分取する。次に、海水の塩分と同等の濃度の塩化ナトリウム溶液をベースとして調製した塩酸を、サンプルの pH が最終的に 3.8 - 4.2 となるように添加する。酸塩基指示薬色素ブロモクレゾールグリーン溶液も添加する。海水サンプルを曝気して二酸化炭素を除去した後、分光光度法で pH を精確に測定する。全アルカリ度は、サンプルの体積(V_{SW}/dm^3)、添加した塩酸の濃度(C_{HCl}/mol dm^{-3})と体積(V_{HCl}/dm^3)、$[H^+]_T$ (= 10^{-pH})の測定値、分取した時の海水サンプルの密度(ρ_{SW}/kg dm^{-3})から、式(2)により計算する。

$$A_T = \frac{C_{HCl} \cdot V_{HCl} - [H^+]_T \cdot (V_{SW} + V_{HCl}) \cdot \rho_{SW}}{V_{SW} \cdot \rho_{SW}} \quad (2)$$

海水の水素イオン濃度や密度は水温によって変化するので、分注時や分光光度測定時には、サンプルの水温も測定しておく。

4、装置

4-1　装置の例

測定装置の概念図の例を図１に示す。塩酸や色素溶液の添加と分光光度測定は、それぞれビーカーと光学セルで別々に行ってもかまわないが、ここに示す例では、分光光度測定に光ファイバーを利用し、塩酸添加と分光光度測定などを同一の測定セル内で行うことで、測定を高精度かつ効率的に行うことができる。

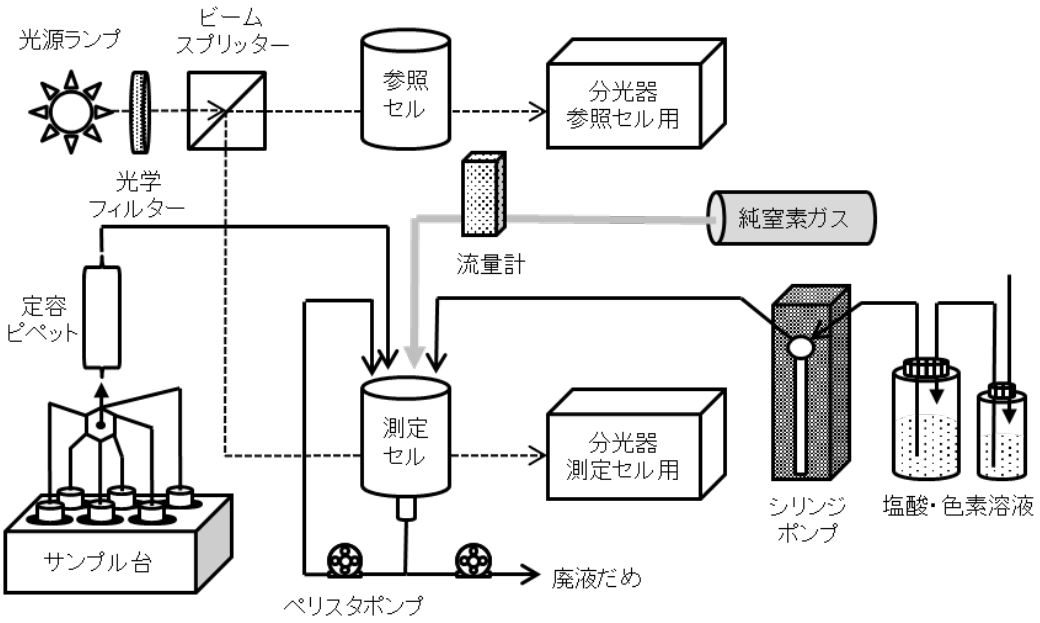

図１　全アルカリ度分析装置の概念図

4-2　海水サンプルの分取

海水サンプルを、採水瓶からビーカーや測定セルにピペット(~50 cm^3)で分取する。ピペットは検定しておく。± 1 μmol kg^{-1} 程度の繰返し精度を実現するには、ピペットに分取したサンプルの水温を±0.1℃以内の不確かさで測定しておく必要がある。

4-3　ビーカーまたは測定セル

ビーカーや測定セルの中で、海水サンプルに塩酸と色素溶液（混合溶液を使用すると便利である）を添加し、撹拌しながら窒素ガスをバブリングして、二酸化炭素を脱気する。

4-4　塩酸と色素溶液の添加

分注量が最大で 5 cm^3 ほどの分注器を使って、塩酸（と色素の混合溶液）を海水サンプルに添加する。分注器は検定しておく。± 1 μmol kg^{-1} 程度の繰返し精度を実現するには、分注体積の再現性がとても高い(±0.001 cm^3)ピストンビュレットなどを使用する必要がある。また、塩酸の温度は一定に保つことが望ましい。

塩酸添加を繰り返すうちに塩酸を入れたボトル内のヘッドスペースが大きくなっていくと、塩酸の濃度が変化してゆく。濃度変化を抑えるには、塩酸（・色素混合液）のボトルを、同じ濃度の塩酸が入ったボトルと配管で連結させ、そのボトル内の塩酸を通った空気が、添加する塩酸のボトルに導入されるようにする。

4-5　塩酸を添加した海水サンプルの曝気

塩酸を添加した海水サンプルを窒素などで曝気し、塩酸添加によって発生した二酸化炭素を除去する。

4-6　分光光度計と光学セル

分光光度計を使って 444nm, 616nm, 750nm の各波長で吸光度を測定する。高い繰り返し精度を実現するには、長光路（8 cm や 10cm）の光学セルを使用する。また、セルホルダーに恒温水を循環させるなどして光学セルのサンプルの水温を制御するとともに、光学セル内の光路を妨げない位置に温度測定プローブを挿入して、吸光度測定時のサンプルの水温を測定する。

4-7　恒温槽

外部循環ポンプ付きの恒温水槽。水温を 25.0±0.1℃に制御できるもの。海水サンプルの温度制御や、光学セルの温度制御などに使用する。

5、試薬類

5-1　窒素ガス

塩酸を添加して酸性にした海水サンプルを曝気して、遊離した二酸化炭素を除去するため、高圧ガスシリンダーから窒素ガスを供給する。

5-2　純水

サンプル測定が終わるたびに、ビーカーまたは測定セルや光学セルを純水で洗う。

5-3　塩酸と指示薬色素の混合溶液

塩酸の濃度が 0.05 mol dm^{-3}、塩化ナトリウムの濃度が 0.65 mol dm^{-3}、ブロモクレゾールグリーンの濃度が 80 μmol dm^{-3} の混合溶液を調製する。

5-3-1　調製に必要な機器類

- 天秤（200 g まで 0.01 mg 以内の不確かさで秤量できるもの）
- マッフル炉（600℃に加熱できるもの）
- 恒温水槽（25.0±0.1℃に制御でき、メスフラスコが標線以上まで入るもの）

5-3-2　調製に必要な器具類

- ガラス製メスフラスコ（3 dm^3）　1 個

- SHOTT DURAN®などのテフロンライナー付きねじ口瓶（1 dm^3） 3 本
- 磁製るつぼ（約 100 cm^3） 1 個
- 磁製るつぼが入るシリカゲル入りデシケーター 1 式
- 秤量瓶（容積数 cm^3） 1 個
- メスシリンダー（500 cm^3） 1 本
- ビーカー（300 cm^3） 1 個

5-3-3 調製に必要な試薬

- 塩化ナトリウム（JIS 一次標準物質、純度 99.98%）
- 塩酸（0.5 mol dm^{-3}）
- ブロモクレゾールグリーンナトリウム塩

5-3-4 調製手順

（前日の準備）

- 塩化ナトリウム約 120 g を磁製るつぼに入れ、600 ℃のマッフル炉内で 1 時間乾燥する。デシケーターに入れて天秤室内で放冷する。
- 秤量瓶とビーカーを洗浄・乾燥した後、天秤室内に置く。

（当日の操作手順）

- 乾燥させた塩化ナトリウム 113.9180 g (1.95 mol) をビーカーに秤取る。
- ブロモクレゾールグリーンナトリウム塩 0.1818 g (240 µmol) を秤量瓶に秤取る。
- 0.5 mol dm^{-3} 塩酸 0.30 dm^3 (0.15 mol HCl)をメスシリンダーに分取し、メスフラスコに注ぎ入れる。メスシリンダーを純水で濯ぎ、塩酸をメスフラスコに完全に注ぎ入れる。
- 秤取った塩化ナトリウムやブロモクレゾールグリーンナトリウム塩をメスフラスコに入れる。秤量容器を純水で濯いで完全に流し入れる。
- メスフラスコに容積の 1/3 程度まで純水を加えて軽く振り、塩化ナトリウム、塩酸、ブロモクレゾールグリーンナトリウム塩を溶かす。このとき、メスフラスコの標線より上に溶液をつけないように気をつける。
- 塩化ナトリウムが溶けたら標線の下まで純水を加え、フラスコを温度 25℃の恒温槽に浸す。塩化ナトリウムが溶けると体積が減るので、溶液を振って均一にし、必要なら純水を足す。
- メスフラスコを恒温槽に 20 分以上浸す。溶液温度が一定になったころに、純水を慎重に加えて標線に合わせる。
- メスフラスコに栓をして良く振り、溶液を均一にする。
- この時点で粒子による濁りが見られるときは、溶液をろ過する。
- ねじ口瓶（容積 1 dm^3）2 本に、調製した溶液を満たしてキャップをする。残った溶液は 3 本目の瓶に入れて保管する。

6、測定手順

6-1 概要

測定手順の概要を表 1 に示す。それぞれの手順で過去の状況と比較し、異常があれば問題を解決し、作業をやり直す。

表 1　分析手順

実施項目
• 分注器類を洗浄し、検定する。光学セルも洗浄する。
• 塩酸・色素溶液のボトルをセットする。恒温槽や分光光度計などの装置の電源を入れ、動作が安定するまで待つ。
• セットした塩酸・色素溶液で分注器やこれに繋がる配管中を置換する。
• 海水サンプルを 2 本ほど分析して動作を確認する（システムの慣らし運転）。分光光度測定は正常か、分注器や塩酸・色素溶液の配管中に気泡がないかを確認し、問題があれば解決する。
• 標準海水の全アルカリ度を測定する。
• 海水サンプルの全アルカリ度を測定する。
• 一連の分析作業の最後に、もう一度、標準海水の全アルカリ度を測定する。
• 分注器類を検定する。測容器、光学セルなどを洗浄する。

6-2　光学セルの洗浄

光学セルが汚れると、光学測定のベースラインが上がるほか、気泡がついて光学測定の障害になりやすくなる。こうした問題が起きたらセルをよく洗う。家庭用洗剤とブラシを使ってかまわない（クレンザーは不可）。セルにブラシが入らなければ、超音波洗浄機を使う。

6-3　測容器類の洗浄と検定

サンプル海水の分取に使うピペットや塩酸・色素溶液の添加に使うビュレットなどの分注器は、一連の分析作業や航海の前によく洗浄し、検定しておく。一連の分析を行った後、洗浄する前に、再び検定し、容量の変化を調べる。

装置が船に常設されているときは、航海の始めにピペットを洗浄したときや、航海の終わりに一連の測定が終わった後に、予め秤量しておいたシーラム瓶に純水を分取し、陸上の実験室で重さを測る。検定のための純水は、繰り返し採取しておく。

検定方法は、Dickson, A.G., Sabine, C.L. and Christian, J.R. (Eds.) 2007, “Guide to best practices for ocean CO_2 measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.“ の第 4 章　SOP 12 や SOP 13 (http://cdiac.ornl.gov/oceans/Handbook_2007.html) などに述べられている。

6-4　標準海水や海水サンプルの測定

6-4-1　セルを洗浄し、海水サンプルを導入する

海水サンプルを光学セルに分取し、光吸収のない波長(730 nm)、指示薬の塩基型(I^{2-})の最大吸収波長(616 nm) と酸型(HI^{-})の最大吸収波長(444 nm)の計 3 波長で、吸光度を測定する。これらを海水サンプルのバックグラウンド吸収とする。

6-4-2　サンプルに塩酸・色素混合液を添加する

ピストンビュレットなどの分注器を使って、ビーカーや測定セルに一定量の海水サンプルを分注する。このとき、サンプルの水温を測定しておく。塩酸と色素溶液を添加する。塩酸添加量は曝気後にサンプルの pH が 3.8－4.2 の範囲に入るように、採取場所・深度や塩分から推定する。添加したら、サンプルを撹拌しながら窒素ガスで曝気する。

6-4-3　セル+海水＋指示薬の吸光度を測定する

6-4-1 で海水バックグラウンドを測定した 3 波長で、もう一度吸光度を測定する。測定にはバックグラウンド測定に使用した光学セルを使用し、測定前にサンプルでよく共洗いする。塩酸の添加前と添加後で、ベースラインの吸光度の変化の大きさが±0.01 の範囲内にあることを確認する。変化がこれより大きかった場合は、セル内壁の光路に泡が付いて吸光度を正確に測定できていなかった可能性が高いので、測定をやり直す。

6-4-4　セルの洗浄

測定が終わったら、光学セルを洗浄する。

6-4-5　注意事項

塩酸の濃度は、ボトル内の残量が少なくなると変化が大きくなるので、残量がボトル容量の半分(500 cm^3)より少なくなったら、新しいボトルの塩酸に交換する。ボトルを交換したら、新しく使う塩酸にこれまで使っていた塩酸が混入しないように、分注器や配管の中を、新しい塩酸で十分に置換する。その際、分注器や配管の中に気泡がないことを確認する。

少なくとも標準海水については、塩酸添加量を変えながら、測定を 3 回以上繰り返すことが望ましい。測定が適正に行われていれば、pH が 3.8－4.2 になる範囲で塩酸添加量を変更しても、A_T の計算値は一定になるはずである。

6-5　全アルカリ度の計算

6-5-1　測定した吸光度の補正

光強度を出力するタイプの分光光度計を使用した場合は、塩酸添加の前後それぞれに対し、444 nm, 616 nm, 730 nm の 3 波長それぞれについて、サンプルセルを通過した光の強度 I と参照セルを通過した光の強度 I_0 から、吸光度 A_λ を計算する。

$$A_\lambda = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \qquad (5)$$

次に、3 波長それぞれについて、塩酸添加後のサンプル測定の吸光度から、添加前の海水バックグラウンド測定の吸光度を差し引く。色素の光吸収がない波長 730 nm における吸光度のデータは、ベースラインのシフトが可視光領域全体にわたって同じ大きさであると仮定して、ベースラインの変化の補正に使う。海水バックグラウンドの吸光度とベースラインの変化を補正したこれら吸光度を、色素のプロトン付加の度合いを反映する吸光度比 A_{616}/A_{434} の計算に使用する。

6-5-2　pH の計算

塩酸・色素混合液を添加した後の海水サンプルの pH を式(6)から計算する。

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}K_2 + \log_{10}\left(\frac{(A_{616}/A_{444})_{25} - \varepsilon_{616}(\mathrm{HI}^-)/\varepsilon_{444}(\mathrm{HI}^-)}{\varepsilon_{616}(\mathrm{I}^{2-})/\varepsilon_{444}(\mathrm{HI}^-) - (A_{616}/A_{444})_{25}\,\varepsilon_{444}(\mathrm{I}^{2-})/\varepsilon_{444}(\mathrm{HI}^-)}\right) \qquad (6)$$

指示薬 HI^-の酸解離定数 K_2 は（単位は mol kg-soln^{-1}。総水素イオン濃度スケールで表現されている）、式(7)で表される。

$$\mathrm{p}K_2 = -\log K_2 = 4.2699 + (2.758\times10^{-3})\cdot(35 - S) \qquad (7)$$

S はサンプルの塩分である。A_{616} と A_{444} はそれぞれ 616nm と 444 nm における補正済み吸光度で、$(A_{616}/A_{444})_{25}$ は水温 25℃における(A_{616}/A_{444})比である。$(A_{616}/A_{444})_{25}$ は吸光度測定と同時に測定した光学セル中のサンプルの温度 t℃と、吸光度の実測値から計算した(A_{616}/A_{444})比から、(8)式により求めることができる。

$$(A_{616}/A_{444})_{25} = (A_{616}/A_{444})\,[\,1 + 0.00907\,(25 - t)] \qquad (8)$$

式(6)で使うブロモクレゾールグリーンのさまざまなモル吸光係数 ε の比を、表 2 に示す。

表 2　ブロモクレゾールグリーンのモル吸光係数比

$\varepsilon_{616}(HI^-)/\varepsilon_{444}(HI^-)$	0.00131
$\varepsilon_{616}(I^{2-})/\varepsilon_{444}(HI^-)$	2.3148
$\varepsilon_{444}(I^{2-})/\varepsilon_{444}(HI^-)$	0.1299

6-5-3　全アルカリ度の計算

海水サンプルの全アルカリ度を式(2)から計算する。海水の密度 ρ_{SW} の計算には、別に測定した海水サンプルの塩分と、分取した時の水温を使用する。

海水サンプルを殺菌するために塩化水銀溶液を添加したときは、これによるサンプルの希釈を補正する。

$$A_T = 1.0002\,A_T'. \qquad (9)$$

式(9)の 1.0002 の数値は、サンプルに 0.02%の体積比で飽和塩化水銀溶液を添加したときの希釈効果を補正する係数である。

6-5-4　データの確認

- 光検出器が感知した光強度を出力する分光光度計を使用した場合は、塩酸添加前後の 444 nm と 616 nm それぞれにおけるサンプルセル側の光量出力が、光量に対して直線

性を示す領域にあることを確認する。

- 塩酸添加後の pH が 3.8－4.2 の範囲にあることを確認する。
- 塩酸の添加前と添加後の 730nm の吸光度の差が、±0.01 以内であることを確認する。

これらの条件が満たされていなければ、測定条件を調整し直し、分析をやり直す。全炭酸濃度測定や pH 測定とは異なり、採水瓶内のヘッドスペースにサンプル中から二酸化炭素が移っても、全アルカリ度の値には影響しない。したがって、採水瓶にサンプルが残っているかぎり、全アルカリ度の測定は繰り返し行うことができる。

7、標準海水の分析

全アルカリ度の測定に使う塩酸の濃度は、±0.02%より高い精確さで標定する必要がある。しかし、塩酸濃度をこれほど精確に標定できない場合は、スクリプス海洋研究所の A.G. Dickson 博士の研究室から提供されている認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)の全アルカリ度を測定し、測定結果と全アルカリ度の認証値から塩酸濃度を決定することも、現実には止むを得ない。

7-1 手順

6.4 の手順で、CRM の全アルカリ度を測定する。分光光度計の応答の直線性や塩酸添加に使用する分注器の分注量の誤差などによる測定の不確かさを評価するため、測定は、塩酸の添加量を変えて添加後の pH を 3.8 - 4.2 の範囲で変化させながら、3 回以上行う。

7-2 塩酸濃度の計算

塩酸の濃度(μmol dm^{-3})は、式(2)から導かれる式(10)で計算する。

$$C_{\mathrm{HCl}} = \frac{\{A_{\mathrm{T}}{}^{\mathrm{CRM}} \cdot V_{\mathrm{CRM}} + [\mathrm{H}^+]_{\mathrm{T}} \cdot (V_{\mathrm{CRM}} + V_{\mathrm{HCl}})\} \cdot \rho_{\mathrm{CRM}}}{V_{\mathrm{HCl}}} \qquad (10)$$

$A_{\mathrm{T}}{}^{\mathrm{CRM}}$ は、CRM の全アルカリ度の認証値である。V_{CRM} は測定のために分取した CRM の体積で、サンプルの分注に使うピペットと同じピペットを使い、式(2)の V_{SW} と等しくする。ρ_{SW} の値は CRM の塩分と分取した時の CRM の水温(25.0℃)から計算する。

8、計算例

8-1 CRM による塩酸濃度の標定

CRM の全アルカリ度認証値 $A_{\mathrm{T}}{}^{\mathrm{CRM}}$	2224.65 μmol kg^{-1}
CRM の塩分	33.357
ピペットの容量 V_{CRM}	42.7495 cm^{-3}
塩酸添加量 V_{HCl}	2.05 cm^3
測定データ	
CRM 分取時の水温と密度	25.14 °C、1.0221 g cm^{-3}
分光光度測定時の水温	25.32° C

分光光度測定値

波長	塩酸・色素添加前		塩酸・色素添加後		吸光度
	サンプルセル	参照セル	サンプルセル	参照セル	
444 nm	25827	21890	18305	21863	0.1490
616 nm	36417	38894	27596	38868	0.1202
730 nm	13883	12699	13816	12679	0.0014

測定結果

A_{616}/A_{414} $= \frac{0.1202-0.0014}{0.1490-0.0014} = 0.8050$

$(A_{616}/A_{414})_{25}$ 0.8026

pH_T 3.8483

$[H^+]_T$ 141.8 μmol kg^{-1}

C_{HCl} 0.050577 mol dm^{-3}

8-2 海水サンプルの全アルカリ度

サンプル海水の塩分 34.424

ピペットの容量 V_{SW} 42.7495 cm^3

塩酸濃度 C_{HCl} 0.050577 mol dm^{-3}

塩酸・指示薬添加量 V_{HCl} 2.15 cm^3

測定データ

海水分注時の水温と密度 25.22°C、1.0228 g cm^{-3}

光度測定時の水温 25.73 °C

光度測定値

波長	塩酸・指示薬添加前		塩酸・指示薬添加後		吸光度
	サンプルセル	参照セル	サンプルセル	参照セル	
444 nm	25876	21904	18460	21891	0.1464
616 nm	36542	38921	25615	38912	0.1542
730 nm	13936	12734	13873	12736	0.0020

測定結果

A_{616}/A_{414} $= \frac{0.1542-0.0020}{0.1464-0.0020} = 1.0540$

$(A_{616}/A_{414})_{25}$ 1.0470

pH_T 3.9678

$[H^+]_T$ 107.7 μmol kg^{-1}

A_T 2373.8 μmol kg^{-1}

9、品質保証

9-1　個々の滴定値の品質

個々のサンプルのデータの品質を保証するため、個々の測定において、吸光度（光量）、塩酸添加後の pH、塩酸添加前後のベースライン(730nm)の吸光度変化を、それぞれ確認する。また、同一サンプルに対して一定量の塩酸を添加したり、異なる量の塩酸を添加したりして測定を繰り返し、再現性を評価する。

9-2　標準海水の分析

標準海水(CRM など)の全アルカリ度測定を行う。結果を *X* 管理図にプロットする。

9-3　反復分析

同一サンプルや標準海水に対して一定量の塩酸を添加したり、異なる量の塩酸を添加したりして測定を繰り返す。それらの分析結果の差を *R* 管理図にプロットする。

参考文献

Breland II, J. A. and R. H. Byrne, 1993. Spectrophotometric procedures for determination of sea water alkalinity using bromocresol green. *Deep-Sea Res. I,* 40, 629–641.

Dickson, A.G. 1981. An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and total inorganic carbon from titration data. *Deep-Sea Res.* 28A: 609–623.

Dickson, A.G., Afghan, J.D. and Anderson, G.C. 2003. Reference materials for oceanic CO_2 analysis: a method for the certification of total alkalinity. *Mar. Chem.* 80: 185–197.

Yao, W., and Byrne, R. H. 1998. Simplified seawater alkalinity analysis - application to the potentiometric titration of the total alkalinity and carbonate content in sea water, *Deep-Sea Res. I,* 45: 1383-1392.

pH

炭酸系に関する第 4 章DIC，第 6 章pH，第 7 章pCO2については、CDIAC の下記 web サイトのそれぞれに該当する SOP の日本語訳が掲載されている。

http://cdiac.ornl.gov/oceans/Handbook_2007.html

DUMMY

pCO_2

炭酸系に関する第 4 章DIC，第 6 章pH，第 7 章pCO2については、CDIAC の下記 web サイトのそれぞれに該当する SOP の日本語訳が掲載されている。

http://cdiac.ornl.gov/oceans/Handbook_2007.html

DUMMY

クロロフルオロカーボン類および六フッ化硫黄

○佐々木建一（海洋研究開発機構）

1、はじめに

クロロフルオロカーボン類（CFCs）は人工的に合成された化合物である。大気中の CFCs は、海面での気体交換によって僅かに海洋表面水に溶解し、海洋循環によって海洋内部に運ばれる。海洋学で過渡的トレーサとして最も広く観測されているのが CFC-11（CCl_3F）と CFC-12（CCl_2F_2）である。これらの化合物は、1930 年代初頭に大気中に放出され始め、大気中の CFCs 濃度は単調に増加し続けた。1980 年代に製造や放出が強く規制されたため、大気中の CFC-11、CFC-12 の濃度上昇は鈍くなり、現在はそれぞれ徐々に減少しつつある。大気中の CFCs 濃度が増加していた頃は、海水中に溶存する CFC-11 や CFC-12 の濃度ないしはそれらの比を大気の履歴と比較することによって水塊の「見かけの年齢」を見積もることに使われたが、現在はそれが困難になった。対照的に、1950 年代より大気中の六フッ化硫黄（SF_6）濃度は急激に増加している。海水中に溶存する SF_6 は、CFCs と同様に保存性成分として扱うことができるため、海洋循環過程を研究するための過渡的トレーサとしての利用価値が非常に高く、CFCs に追加するトレーサとして期待されている。

この節では、CFC-11 と CFC-12 もしくはそれらと SF_6 を同時に定量する方法について記載する。Repeat Hydrography のような最高精度の観測を行う場合には、GO-SHIP Repeat Hydrography Manual の CFC と SF_6 の節（Bullister and Tanhua, 2010）も合わせて参考されたい。

2、測定法

CFC-11、CFC-12 そして SF_6（今後これらを全て表す場合には CFC:SF_6 とする）を測定する場合、通常は船上で試料を採取した直後にパージ＆トラップ法によって溶存ガスを抽出し、ガスクロマトグラフィを用いて分析する。測定する濃度範囲は、CFCs で 0～10pmol kg^{-1}（pmol = 10^{-12} mol）程度、SF_6 では 0～ 数 fmol kg^{-1}（fmol = 10^{-15} mol）程度と極めて低く、検出器には高感度の電子捕獲型検出器を用いる。船上で CFCs を迅速に測定するための技術はいくつも公表されており（たとえば Bullister and Weiss, 1988; Bulsiewicz et al., 1998）、SF_6 を同時に分析するための技術についても複数の報告がある（たとえば Vollmer and Weiss, 2002; Bullister and Wisegarver, 2008）。日本でもそれらをもとに一部改修した方法で幾つかのグループが CFCs や SF_6 の測定を行っている（たとえば Sasaki et al., 2014）。船上での分析が困難な場合は、試料を持ち帰って陸上分析することも可能であるが、後述するように問題点も多い。

溶存 CFC:SF_6 の分析システムは、パージ&トラップをガスクロマトグラフに接続した一つのシステムである。以下にパージ＆トラップ部とガスクロマトグラフ部について説明する。なお、システムに供給されるガス（多くの場合は窒素ガス）は、モレキュラーシーブ 13X カラムなどのガスクリーナでバルブなどに由来する不純物を取り除く。

2-1 パージ＆トラップ部

パージ＆トラップ部は大まかに、海水定容部、脱気部、トラップ部、および標準ガスや大

気試料を導入するためのガスループ部に分かれる。

海水定容部:分析に用いられる海水試料の容量は、CFCs の分析のためには数十 ml であり、濃度が CFCs に比して 3 桁低い SF_6 を分析するためには 200ml 以上である。航海の前後で精密に容量を検定し、海水分析時には定容部の水温を記録して、正確な容量を算出する。

脱気部：ここで海水試料から溶存ガスを脱気・抽出する。パージ法（たとえば Bullister and Wisegarver, 2008）と真空脱気法（たとえば Law et al., 1994）の二通りが提案されている。筆者はパージ法を用いている。一回の脱気で概ね 99%以上の溶存 CFC:SF_6 が脱気できるように、試料に通じるガスの流量（流速と時間の積）や脱気管の形状を調整する。一般にガスの流量を多くし、脱気管の形状を長細くすると脱気の効率が良くなる傾向にある。筆者のシステムでは、外径 30 mm、高さ 500 mm 程度のガラス製脱気管を採用している。

トラップ部：試料から抽出した CFC:SF_6 を吸着・濃縮するために用いる。ステンレス管に適切な吸着剤を詰めた一種のパックドカラムである。クロマトグラムピークをシャープにするため、外径 1/16 インチ、内径約 1mm のステンレス管を用い、トラップの容積を小さくする。分析する成分によって充填する吸着剤を選択する。筆者は、CFCs のみを分析する際には Porapak T （Waters 社製）を、SF_6 を同時定量する場合には、Porapak T もしくは Porapak Q（Waters 社製）と Carboxene1000（Supelco Analytical 社製）を詰めたトラップを作成して使用している。吸着剤の充填長は、通常 5cm～20cm 程度の範囲で試料処理中に目的成分が保持されるように検討して決める。ガス試料の吸着時にはトラップを冷却する。上記のトラップで SF_6 を分析する場合は、-70℃程度までの冷却が必要である。脱着時にはトラップを加熱する。加熱時間が長いとトラップ内でガス試料が拡散し、クロマトグラムのピークがブロードして定量性に悪影響を与えるので、出来るだけ短時間で加熱できるように工夫する。トラップを 170℃程度まで加熱する必要があるので、電気的な加熱法を採用する。加熱時には充填剤の最高使用温度を超えないように、オーバーシュートには気をつける。

ガスループ部：機器の較正や感度確認、或いは大気の分析を行う際にガス試料を定容するために用いる。ステンレス管を用いて作成する。ステンレス管の内壁面の状態によっては、ガスの吸着が起きる場合があるので、電解研磨などの内面処理が施された管を使用する。また、ガスループの格納場所をヒーターで温めておくことも吸着を防ぐのに有効である。ガスループの使用前には精密な容量検定を行い、使用時には温度と気圧を計測して補正を行う。

2-2 ガスクロマトグラフ部

パージ&トラップ部で抽出・濃縮したガス試料をプレカラムおよびメインカラムで分離し、溶出してくる成分を電子捕獲型検出器で順次検出する。充填カラムとキャピラリカラムを用いる方法がある。筆者は充填カラムより理論段数が高いワイドボアキャピラリカラムを用いている。キャリアガスには通常は純窒素ガスを用いる。

プレカラム：トラップ部から最初にガス試料が導入される。CFC:SF_6 はこのカラム上で粗分離され、メインカラムに送られる。CFC-11 よりも保持時間が長い物質がプレカラムから溶出する前に、別のキャリアガス供給ラインにこのカラムを接続してバックフラッシュすることにより、不要な高沸点成分をメインカラムや検出器に送ることなく、分析時間を短縮することが出来る。

メインカラム：プレカラムから送られた目的成分をさらに分離し、溶出時間の短い物質か

ら順に検出器へ送る。

検出器：電子捕獲型検出器を用いる。β線源として Ni-63 を用いる密封放射線源である。日本の法律では、船舶への持込などには手続が必要だが、表示付認証機器の場合はその手続が比較的簡単である。検出器からの信号を A/D 変換してデジタル形式で取り込み、ピーク面積を積分する。

2-3 分析操作手順の例

以下に、海洋研究開発機構が行っている標準的な分析手順を記す。分析システムが正常に稼働し、後述する試料採取を厳密に行えば、前述した測定濃度範囲において、CFC-11 と CFC-12 については +/- 0.005 pmol kg^{-1} または +/- 1%（いずれか大きい方）、SF_6 については +/- 0.030 fmol kg^{-1} または +/- 6%（いずれか大きい方）の精度で分析が可能である（Sasaki et al., 2014）。

2-3-1 海水分析

パージ＆トラップ部に海水試料容器を接続し、海水試料を海水定容部に分取する。トラップ部が十分に冷却されていることを確認し、分取した試料の水温を記録した後、脱気管に試料を移送し、脱気を開始する。脱気ガスの流量は CFCs のみの分析システムで 120ml min^{-1}、CFC:SF_6 システムで 220ml min^{-1} である。抽出したガス試料は、過塩素酸マグネシウム乾燥管を通じてトラップ部に導入され、CFC:SF_6 が吸着・濃縮される。8 分（99%以上の CFC:SF_6 が脱気される）後、バルブ操作でトラップを隔離し、ヒーターでトラップを加熱し、CFC:SF_6 を脱着する。ここまでの処理に掛かる時間は約 15 分である。ガスクロマトグラフのデータ取得を開始し、キャリアガスの経路がトラップ内を通るようにバルブを切り替え、脱着したガス試料をプレカラムに送る。事前に調べたプレカラムからの目的成分の溶出時間が経過した直後にプレカラムを別のガスラインに切り替え、不要な成分をバックフラッシュする。目的成分は、メインカラムでさらに分離され、SF_6、CFC-12、CFC-11 の順で検出器に溶出し、クロマトグラムが得られる。ガスクロマトグラフによる CFC:SF_6 分析に要する時間は約 15 分である。トラップからプレカラムへのガス試料の移送が終了した直後、パージ&トラップ部では次の海水試料の処理を開始するステップに入る。まずトラップ内部に残っている可能性がある微量成分を除去するため、トラップ部を加熱したまま 30 秒ほど窒素ガスを流してクリーニングし、トラップを隔離して冷却を開始する。その間に次の海水試料の分取作業を行う。

ガスクロマトグラフのプレカラムには、ワイドボアキャピラリカラム CP-Silica Plot（Agilent 社製）、メインカラムには CP-Silica Plot と CP-PoraBOND Q（Agilent 社製）のワイドボアキャピラリ複合カラム（分離を確認しながらそれぞれの長さを調節する）や、SF_6 の分析時にはさらに 1/16 インチステンレス管にモレキュラーシーブ 5A を 10cm 程度詰めたパックドカラムを接続して分離を行っている。海洋研究開発機構では、これらのカラム類の組み合わせ等について、分離能および分析精度の向上を目指してさらなる検討を進めている。

2-3-2 標準ガスおよび大気試料の分析

パージ＆トラップのガスループに標準ガスもしくは乾燥大気試料を導入する。ガスループの末端に接続したガス排出チューブからガス試料が出ていることを確認する。導入終了後、

ガスループ内の気圧が室内の気圧と平衡になるのを待つため、1 分間放置する。ガスループの温度、室内の気圧を記録した後、ループをラインに接続し、トラップにガス試料を移送する。同じガスループで複数回のガス試料を打ち込む場合は、その操作を繰り返す。それ以外の操作は海水分析の場合と同様である。

2-3-3 その他の事項

較正曲線（「4、較正曲線および感度確認」を参照）を作成し、システムブランク（海水や標準ガス等を導入せずにシステムを走らせる）を確認した後、海水の分析に取りかかる。我々のシステムは、注意して操作すればキャリーオーバー（前分析の影響）はほぼ無視できるが、念のため経験上最も濃度が低いと思われる試料（北太平洋の場合は通常は底層水）から徐々に濃度の高い試料へと分析を進める。5〜10 本の海水試料を分析するごとに感度確認用の標準ガスの分析とシステムブランクの確認分析を行う。標準的な手順では、各測点の表面付近の試料の分析時に脱気効率（一回の脱気操作で抽出できる CFC:SF_6 の割合を調べるため、脱気処理後の海水試料を排出せずに再度脱気処理して分析を行う）を確認する。

過塩素酸マグネシウム乾燥管は、標準的には 1 測点の海水試料の分析が終了する度に交換する。過塩素酸マグネシウム乾燥管から汚染物質が排出され、クロマトグラムに妨害ピークが出現して分析に影響が出ることがある。その場合は、予め乾燥管に純窒素ガスを通じながら 200℃に加熱し、1 時間程度クリーニングしてから用いることで、汚染を低減できる。この方法によっても定量に影響する妨害が出る場合は、試薬の汚染が疑われるので、異なるロットの試薬を使用するなどの措置を講ずる。

システムの接ガス部（流路切替に用いるバルブ、圧力調整器など）には、禁油性の部品を用いる。バルブの動作をある程度自動化しておくと、分析条件が一定となりより高精度化が期待できる。なお、プレカラムの切替については、特に一定のタイミングに保つ必要があるため、自動化あるいはタイマーでの動作とするべきである。

3、試料の採取

CFC:SF_6 の採水で注意すべき点は、中層〜深層水の CFC:SF_6 は極めて低濃度であり、それらの水と気体交換平衡にある（あった）大気の CFC:SF_6 濃度は、現代の大気のそれと比べて極めて低く、そのような海水試料は、空気と接触することで容易に汚染されるという点である。試料と大気の直接の接触による汚染に加え、採水ボトル類を経由した汚染にも留意する必要がある。特に 1990 年代前半に建造された船舶などに使用されている断熱材には、その形成過程で特定フロン類（CFC-11 や CFC-12 を含む）が使用されているものがあり、大きな汚染源になる可能性があるため注意が必要である。また、分析システムに不具合が生じていないかの確認や表面水の飽和度の確認のため、可能であれば洋上大気試料を採取し分析する。

3-1 ニスキンボトルの洗浄

Bullister and Tanhua (2010)によれば、航海の前に、慎重に弱溶剤（例えばイソ-プロパノール）でニスキンボトルを洗浄することによって試料の汚染を低減できる。筆者のグループでは、中性洗剤で十分に洗浄を行い、各キャストの前に 3 倍程度に希釈したアセトンをしみこませた清浄な布でボトルの外壁や CTD フレームなどの観測作業中に汚染しやすい箇所を拭

き取っている。ニスキンボトルのシールに用いる O リングは、中性洗剤で洗浄した後、3 倍に希釈したアセトンを清浄な布にしみこませて拭き、O リングの素材中に存在する任意の汚染ガスをできる限り除去するため、真空オーブン中で 24 時間程度真空引きしている。O リングは 2-3 セット分用意しておき、観測航海中に時間があるときには、ボトルの O リングを上記の手法でクリーニングした別のセットに交換する。シップタイムに余裕があれば、Bullister and Tanhua (2010)の方法によって航海中に複数回ボトルブランクを見積もっておき、データの補正を行う方が良い。特別に設計されたボトルがいくつかのグループによって製造されており（例えば、Bullister and Wisegarver, 2008）、海水と O リングとの接触を最小限にすることで汚染を低下させている。

3-2 採水器からの試料採取

標準的には、CFC:SF_6 試料は、採水器から最初に採取する。筆者が所属するグループでは、溶存酸素試料の分取の直後速やかに CFC:SF_6 試料を採取している。迅速に行うことで、有意な汚染が検出されないことは確認済みである。

CFCs の分析用には、通常は 100cc 程度のガラスシリンジを用いて大気と海水試料の接触を出来るだけ避けて採取する。SF_6 の分析用にはさらに多くの試料が必要となる。ガラスシリンジに代わり、いろいろなタイプのガラスアンプルに採取することもある（Bulsiewicz et al., 1998; Vollmer and Weiss）。筆者のグループでは、図 1 のようなアンプルに採取している。試料採取前にはアンプル内部の大気でサンプルが汚染されるのを防ぐため、予め純窒素でアンプル内部を置換しておく。このアンプルでは、海水試料導入口のコックの先端とニスキンボトルとをチューブで繋いで試料採取するが、使用するチューブの素材によっては有意な汚染が検出される。我々は、中性洗剤で洗浄して乾燥し、さらに真空引きした薄肉のタイゴンチューブを用いている。ボトル容量の 2 倍量の海水試料をオーバーフローした後、下流から順にコックを閉じてシールする。採取から通常 12 時間以内に分析するが、それまでの間は水温をコントロールした冷却水槽（出来れば水槽の窒素バブリングを行い、試料汚染の可能性を低減する）内で保管する。短期間の航海では、このまま冷却保管し、持ち帰り後に速やかに分析することによって、比較的軽度な汚染で測定値を得ることも出来る。この場合、保管中の汚染の度合いを見積もるために、トレーサフリーの海水試料を多めに持ち帰る方が良い（北太平洋であれば深層水でよい）。長期航海の場合でも、アンプルの形状を工夫し、先端をバーナーで溶封することで、陸上に持ち帰って後日に分析を行うことも可能であろう。

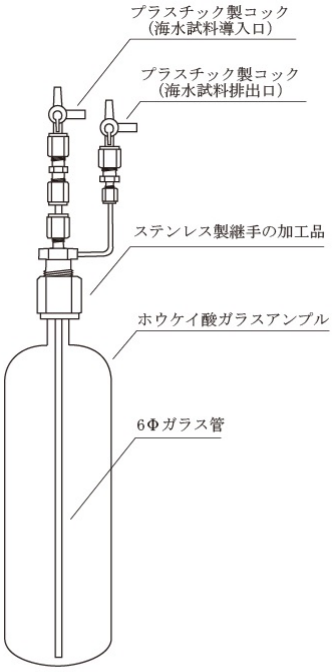

図 1．海洋研究開発機構が試料採取に使用しているガラスアンプル。海水試料導入口とニスキンボトルをチューブで繋ぎ、試料を採取する。

ただし、陸上分析には利点もあるが同時にかなりの不利

な点もある。まず利点としては、陸上分析の場合は分析システムを船上に持ち込んで操作する必要はない。また、特に日本の場合は、放射線源を船上に持ち込むための複雑な手続をなくすことが出来る。一方で、アンプルの口を溶封して持ち帰る場合は、その技術が必要になる。陸上に持ち帰ってからの分析にまだ多大な時間を要する。船上分析とは異なり、航海が終了するまで（陸上分析するまで）試料採取の一連の操作に起因する問題等による試料の汚染が分からないので、最悪の場合はデータの取得に失敗することになる。

分析精度を推定するため、反復海水試料（同一の採水器から 2 本以上の海水試料を採取）を頻繁に分析する。表層付近の高濃度試料と中層付近の中濃度試料など、一測点あたり 2-3 以上の層で反復試料を採取し、分析することを推奨する。表面近傍の試料は、各測点で採取し、表面水の飽和度を確認する。

3-3 大気サンプリング

分析システムに異常がないかの確認、および表面水の飽和度の確認を行う上で、可能であれば洋上大気試料を繰り返し採取して分析する。船舶からの汚染を防ぐため、可能な限り船舶の前方から航走中にサンプリングする。筆者らは数十メートルのデカロンチューブを設置して実験室内のポンプに接続し、船舶の前方から大気を連続的に引き込んでいる。その気流からガラスシリンジに大気試料をサンプリングし、数分以内に分析している。分析システムへの導入時には過塩素酸マグネシウム乾燥管を通じて水蒸気を除去する。

4、較正曲線および感度確認

海洋および大気中の CFC:SF_6 の測定値は、混合標準ガスを用いて較正される。日本では、ジャパンファインプロダクツ株式会社などから提供される。CFC:SF_6 の組成は、海水のそれに近いものを用いる方が便利であり、重量充填法によって調整してもらう。これらの化合物に対する電子捕獲型検出器の応答には直線性がない。したがって正確に海水試料中のこれらの化合物の量を決定するためには、試料の濃度範囲をカバーする複数点較正曲線を作成しなければならない。

トラップする標準ガスの量は、異なる容量をもつ複数のガスループを用いて注入することによって、または同じガスループで複数回注入してトラップすることによって、或いは異なる圧力で注入することによって変化させることができる。このため、較正に使用する標準ガスは、CFC:SF_6 を適当な比で含んでいる物が一本あれば良く、混合比が異なる標準ガスを較正曲線の作成のために何本も用意する必要はない。ただし、標準ガス中の CFC:SF_6 混合比は ppt（10^{-12}）レベルと極めて低く、変質しやすいため、複数本の標準ガスを用意して時々クロスチェックする必要がある。導入した CFC:SF_6 の量に対してクロマトグラムピークの面積をプロットして較正曲線を得る。フィッティング方法の例は Bullister and Weiss（1988）に記載されている。標準ガスを複数回注入する場合は、時間が掛かるので、トラップ時間を海水試料の分析時より長くする場合もある。ただし、長いトラップ時間でも、CFC:SF_6 がトラップ部に保持され続けることの確認と、クロマトグラフピークのブロードや分析ブランクの蓄積の評価が必要になる。

海水試料の分析の合間に、定期的に標準ガスを分析して、システムの感度をチェックする必要がある。較正曲線は可能な限り一日 1 回の間隔で作成するとともに、システムのメンテ

ナンスなど、感度が変化する可能性のある操作（カラムの焼き出し、大気へのシステムの開放など）の前後それぞれで作成する。分析機器の応答（検出器の感度など）がドリフトしている間は、より頻繁に実行する必要がある。筆者の経験上、大気圧の変化に応じた（おそらく検出器内圧の変化による）感度変化が見られる場合がある。大気圧を連続的にモニタしておくことは、後の感度補正を助ける情報となるかも知れない。

較正に用いる標準ガスは、本来であれば CFC-11 と CFC-12 については、SIO-98 キャリブレーションスケール (Prinn et al., 2000)、SF_6 については SIO-05 スケール (http://bluemoon.ucsd.edu/pub/cfchist/)で較正されているべきであり、これらのスケールに較正するための参照標準ガスが NOAA PMEL Ocean Tracer より供給されているが、日本の法律によって特定フロンの輸入が厳しく制限されている。この参照標準ガスを入手する努力は今後もすべきだが、それまでの間は少なくとも日本国内で統一した標準スケールを保持しておき、可能となった時点で全データを SIO-98 および SIO-05 スケールに変換するべきであろう。

5、データの品質評価

データの偶然的および系統的バイアスを見つけるために、慎重なデータ品質評価を行う必要がある。

一次品質管理（1st QC）は、異常値や明らかなデータのエラーを識別するために行われる。まず CFC:SF_6 濃度の鉛直分布を確認する。鉛直分布は、合理的に滑らかであることが多く、異常値は容易に発見できる。他の項目（例えば、溶存酸素）の鉛直分布と比較することで、明らかな異常値が CFC:SF_6 に固有のものであるか（この場合は、おそらく分析不良）、または他の項目でも見られているどうか（採水器の問題などが考えられる）を判断する。次に、CFC-11 濃度に対して CFC-12 や SF_6 の濃度をプロットする（実際には、平衡大気中の分圧に換算してプロットする）。通常は、誤差の範囲内で大気の履歴と矛盾しない範囲にプロットされる。さらに、表面近傍の飽和度を確認する。CFC:SF_6 の溶解度（F：mol kgl^{-1} atm^{-1}）は、水温（絶対温度 T）と塩分（S）の関数として下記の式で与えられる。

$$\ln F = a_1 + a_2 (100/T) + a_3 \ln(T/100) + a_4 (T/100)^2 + S [b_1 + b_2 (T/100) + b_3 (T / 100)^2]$$

ただし、SF_6 の溶解度関数には 4 項目は含まれない。各係数は表 1 の通りである。この式で求めた溶解度に乾燥大気中の CFC:SF_6 分圧（atm）を乗ずることで、その大気に対する CFC:SF_6 飽和濃度を得ることが出来る。通常の場合、表面水の飽和度は現代大気に対して 100% に近い数値となる。ただし、湧昇域や極めて深い混合域、或いは表層が強く冷却／加温されている場合は 100%飽和から大きくずれていることもある。航海中に試料の分析を行いながら予備的なデータの品質管理を行うことにより、採水手順の問題、分析システムの不具合などを検出することができる。観測中にそれを修正することができれば、良好なデータを得ることが可能となる。

二次品質管理（2nd QC）は、データセンターなどに報告されたデータセット間の系統誤差を定量的に見積もるために行われる。同じ領域で二つの独立した観測で得られたデータを比較して行うクロスオーバー解析 (Johnson et al., 2001)である。この解析は季節変動などの短期的な変動の影響を避けるため深層のデータを用いて行うのが通常であるが、そのような水塊

表１．CFC:SF_6の溶解度（mol kg^{-1} atm^{-1}）を算出するための係数一覧

	CFC-11*1	CFC-12*1	SF_6*2
a_1	-232.0411	-220.2120	-82.1639
a_2	322.5546	301.8695	120.152
a_3	120.4956	114.8533	30.6372
a_4	-1.39165	-1.39165	―
b_1	-0.146531	-0.147718	0.0293201
b_2	0.093621	0.093175	-0.0351974
b_3	-0.0160693	-0.0157340	0.00740056

*1：Warner and Weiss (1985)，　*2：Bullister et al. (2002)

では CFC:SF_6 の濃度が極めて低く、比較しても意味がない。さらに CFC:SF_6 が過渡的トレーサであるという点もこの解析を困難にしている。２つの独立した観測が近い時期に行われている場合には、極めて限定的に行われることがあるが、本稿ではこれ以上の記述は避けることとする。

6、謝辞

本稿の取り纏めにあたって、株式会社マリン・ワーク・ジャパンの鷺島克啓氏、佐藤弘康氏、畳指祥子氏には現場観測で行ってきた CFC:SF_6 分析の経験に基づいて有用な意見を多数頂いた。また、気象大学校の時枝隆之博士により初稿の査読をして頂いた。ここに感謝申し上げる。

参考文献

Bullister, J.L., and Tanhua, T. (2010): Sampling and measurement of chlorofluorocarbons and sulfur hexafluoride in seawater. In *The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines.* E.M. Hood, C.L. Sabine, and B.M. Sloyan (eds.), IOCCP Report Number 14, ICPO Publication Series Number 134. Available online at http://www.go-ship.org/HydroMan.html.

Bullister, J.L. and D. P. Wisegarver (2008): The shipboard analysis of trace levels of sulfur hexafluoride, chlorofluorocarbon-11 and chlorofluorocarbon-12 in seawater, Deep-Sea Research I, 55, 1063 – 1074.

Bullister, J.L. and R. F. Weiss (1988): Determination of CCI3F and CCl2F2 in seawater and air, Deep-Sea Research, 35, 839 – 853.

Bullister, J. L., D. P. Wisegarver, and F. A. Menziab (2002): The solubility of sulfur hexafluoride in water and seawater. Deep-Sea Res. I, 49, 175 - 187.

Bulsiewicz, K., ,H. Rose, O. Klatt, A. Putzka, and W. Roether (1998): A capillary-column chromatographic system for efficient chlorofluorocarbon measurement in ocean waters. J. Geophys. Res., 103, 15,959-15,970.

Johnson, G. C., P. E. Robbins, G. E. Hufford (2001): Systematic adjustments of hydrographic sections for internal

consistency. J. Atmos. Ocean. Technol., 18, 1234-1244.

Law, C. S., A. J. Watson, and M. I. Liddicoat (1994): Automated vacuum analysis of sulphur hexafluoride in seawater: Derivation of the atmospheric trend (1970-1993) and potential as a transient tracer. Mar. Chem. 48, 57-69.

Sasaki, K., K. Sagishima, S. Tatamisashi, H. Sato, and M. Orui (2014): Chlorofluorocarbons and Sulfur Hexafluoride, *WHP P10 Revisit in 2011 Data Book*, H. Uchida et al. (Eds.), JAMSTEC, Yokosuka, Kanagawa, Japan, 72 - 75.

Prinn, R. G., R. F. Weiss, P. J. Fraser, P. G. Simmonds, D. M. Cunnold, F. N. Alyea, S. O'Doherty, P. Salameh, B. R. Miller, J. Huang, R. H. J. Wang, D. E. Hartley, C. Harth, L. P. Steele, G. Sturrock, P.M. Midgley, and A. McCulloch (2000): A history of chemically and radiatively important gases in air deduced from ALE/GAGE/AGAGE. J. Geophys. Res., 105, 17,751 - 17,792.

Vollmer, M. K. and R. F. Weiss (2002): Simultaneous determination of sulfur hexafluoride and three chlorofluorocarbons in water and air. Mar. Chem., 78, 137 - 148.

Warner, M. J. and R. F. Weiss (1985): Solubilities of chlorofluorocarbons 11 and 12 in water and seawater Deep-Sea Res., 32, 1485 - 1497.

DUMMY

炭素同位体比（$\Delta^{14}C$、$\delta^{13}C$）

○熊本雄一郎（海洋研究開発機構）、荒巻能史（国立環境研究所）

1、はじめに

自然界に存在する炭素同位体は ^{12}C、^{13}C、^{14}C の 3 つで、^{12}C に対する ^{13}C、^{14}C の存在量比はそれぞれ約 10^{-2} と 10^{-12} である。^{12}C と ^{13}C は安定同位体であるのに対して、^{14}C は大気中窒素と宇宙線の反応をその起源とする半減期約 5730 年の放射性同位体である。$^{13}C/^{12}C$ 比は環境中の様々な同位体分別効果によって変動するのに対して、$^{14}C/^{12}C$ 比はそれらに加えて ^{14}C の放射壊変によって時間経過とともに減少する。そのため両者は海洋における炭素循環、および海洋循環研究にとって有用なトレーサとなっている。本項では、海水に溶存している炭酸イオン、重炭酸イオン、分子状二酸化炭素の総和、すなわち溶存無機炭素（dissolved inorganic carbon: DIC）の炭素同位体比の測定方法について述べる。

安定炭素同位体比、すなわち $^{13}C/^{12}C$ 比分析は、デュアルインレット（Dual Inlet）方式の安定同位体質量分析計（Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS）によって高精度な測定が可能となった（McKinney et al., 1950）。海水中 DIC の $^{13}C/^{12}C$ 比を IRMS によって測定するためには、海水から DIC を抽出して二酸化炭素（CO_2）ガスとして精製する必要がある。近年では、試料毎の CO_2 抽出・精製作業を必要としない、連続フロー型前処理装置を IRMS に連結する分析方法（例えば小熊ら, 2012）や、キャビティ・リングダウン（cavity ringdown）分光計によって連続的に海水中 DIC の $^{13}C/^{12}C$ 比を測定する方法も報告されている（例えば Becker et al., 2012）。$^{14}C/^{12}C$ 比は、環境中の同位体分別効果と放射壊変の２つの要因で変動するため、後者を議論するためには $^{13}C/^{12}C$ 比を用いて前者の効果を補正しなければならない。そのため、通常 $^{14}C/^{12}C$ 比は $^{13}C/^{12}C$ 比と合わせて測定される。本項では、海水中 DIC の $^{13}C/^{12}C$ 比と $^{14}C/^{12}C$ 比を同時に測定することを前提とし、海水試料から抽出・精製された CO_2 ガスの $^{13}C/^{12}C$ 比を 1 検体づつ IRMS によって測定する方法について述べる。

1940 年代後半、自然界において宇宙線起源（天然起源）の ^{14}C が発見され、それが 10^3~10^4 年の年代決定に応用できることが報告された（Anderson et al., 1947; Libby et al., 1949）。放射性炭素同位体比、すなわち $^{14}C/^{12}C$ 比は約 5730 年の半減期を持つ ^{14}C の放射能分析によって測定されてきた。放射能分析では、^{14}C が放射性崩壊する際に放出される β 線を、ガス比例計数装置、液体シンチレーション計数装置などを用いて計測し、試料に含まれる比放射能（単位質量あたりの放射能の強さ）を測定する。海水中 DIC の ^{14}C の測定は 1950 年代から開始されたが（例えば Linick et al., 1978）、放射能分析のためには数百リットルの海水から CO_2 を抽出・精製する必要があり、初期の観測では海洋深層からの試料採取は限られていた。1970 年代に米国の主導で実施された GEOSECS（Geochemical Ocean Section Study）計画では、全海洋 39 観測点の海面から海底までの計 18 層から、各々250L の海水試料が大量採水器により採取された。そして船上で試料に含まれる CO_2 を水酸化ナトリウム水溶液に吸収して実験室に持ち帰り、回収した CO_2 からアセチレンを合成してガス比例計数装置で比放射能が測定された（Stuiver and Östlund, 1980; Östlund and Stuiver, 1980; Stuiver and Östlund, 1983）。国内では 1980 年代頃から、このアセチレン法に加えて（Gamo and Horibe, 1983）、アセチレンから合成され

たベンゼンをトルエンやキシレンのような有機溶媒に溶かして蛍光物質を作製し、液体シンチレーション計数装置で比放射能を測定する方法によっても ^{14}C 測定が実施されてきた（Tsunogai et al., 1995）。

1970 年代後半、加速器質量分析（Accelerator Mass Spectrometry, AMS）法が開発され（Muller, 1977; Purser, 1977）、放射能測定法に比べて 1000 分の 1 以下の試料量で ^{14}C の測定が可能となった。1990 年代になると、第二世代と呼ばれる加速電圧の低いタンデム加速器（加速電圧 2〜3MV）を用いた AMS 専用装置が開発され、海洋学の分野でも AMS 法が広く利用されるようになった。1990 年代に全海洋規模で観測が行われた WOCE（World Ocean Circulation Experiment）計画では、1 万検体以上の海水試料（500 mL 以下）が全海洋で採取され AMS 法によって ^{14}C が測定された（Key et al., 2004）。放射能測定では ^{14}C が放射性崩壊する際に放出される β 線を測定するのに対して、AMS 法では ^{14}C 原子の個数を直接的に測定する。したがって、後者では半減期の長短に関係なく一定の計測時間で高感度な測定が可能となる。^{14}C 測定の場合、炭素量 1mg の試料を 30 分程度計測することで、0.5%程度の不確かさ（uncertainty）を持つ測定結果を得ることができる。現在、^{14}C の測定は AMS 法によるものが主流となっており、本項においても AMS 法について述べる。

AMS 法による ^{14}C の測定方法を詳述したマニュアルは、WOCE 計画のために準備されたものが広く引用されている（McNichol and Jones, 1992）。最近、その更新版ともいえるマニュアルが出版されたが、記載内容に大きな変更はない（McNichol et al., 2010）。国内では、1997 年に日本原子力研究所（現原子力研究開発機構）に導入された AMS 施設で実施されている試料処理、測定方法の詳細が報告されている（荒巻ら, 1999）。これらのマニュアルでは、船上での試料採取と試料前処理方法が重点的に記述されており、試料分析についての記載は多くない。本項に記載された試料採取および試料前処理方法は、既存のマニュアルの内容を踏襲するものである。本項では、それらに加えて試料分析方法についての記述を加えることで、海水中 DIC の炭素同位体比測定のための試料採取から測定結果の報告までを概観することができるように努めた。以下、定義と単位（2）、試料採取方法（3）、試料前処理方法（4, 5）、分析方法（6）について順に記載する。

2、定義と単位

2-1、$\delta^{13}C$

試料中の $^{13}C/^{12}C$ 比（R_{SA}）は、標準物質の $^{13}C/^{12}C$ 比（R_{ST}）との千分率偏差（$\delta^{13}C$ [‰]）として表される。

$$\delta^{13}C = (R_{SA} / R_{ST} - 1) \times 1000. \quad (1)$$

米国北カロライナ州 Pee Dee 層と呼ばれる地層から出たベレムナイト（Belemnites）化石（PDB）が、$^{13}C/^{12}C$ 比の一次標準物質である。したがって $\delta^{13}C$ は、正確には $\delta^{13}C_{PDB}$ と表記される。しかし、PDB はすでに枯渇しており、PDB に対して値付けをされた二次標準物質が、オーストリア・ウィーン（Vienna）に本部を置く国際原子力機関（International Atomic Energy Agency, IAEA）から配布されている。この二次標準物質（Vienna PDB）に対して値を付けら

れた $\delta^{13}C$ を、$\delta^{13}C_{VPDB}$ と表記する。

***2-2*、$\Delta^{14}C$**

$^{13}C/^{12}C$ 比と同じく、試料中の $^{14}C/^{12}C$ 比（A_{SA}）は標準物質の $^{14}C/^{12}C$ 比（A_{ST}）との千分率偏差（$\delta^{14}C$ [‰]）として表される。

$$\delta^{14}C = (A_{SA} / A_{ST} - 1) \times 1000. \quad (2)$$

$^{14}C/^{12}C$ 比の一次標準物質は、仮想的に「19 世紀の木材」とされている。これは大気中核実験によって生成した ^{14}C の影響を受けていない木材という意味であるが、そのような木材を入手することは現実的には不可能であるため、米国国立標準技術研究所（National Institute of Standards and Technology, NIST）が配付している 2 種類のシュウ酸、すなわちシュウ酸 I（Oxalic Acid, SRM4990）とシュウ酸 II（Oxalic Acid, SRM4990C）が標準物質として広く利用されている。このシュウ酸 I の $^{14}C/^{12}C$ 比（A_{OX}）をもとにした「現代」の木材の $^{14}C/^{12}C$ 比（A_{ON}）は以下のように定義された（Karlén et al, 1966）。

$$A_{ON} = 0.95\, A_{OX} [1 - \{2 (19 + \delta^{13}C_{PDB}) / 1000\}], \quad (3)$$

ここで $\delta^{13}C_{PDB}$ はシュウ酸 I の $\delta^{13}C$ 値であり、シュウ酸と木材間の同位体分別効果の補正がなされている。ファクターの「2」は、$^{14}C/^{12}C$ 比の同位体分別効果が近似的に $^{13}C/^{12}C$ 比のそれの 2 倍であることを表している。ただし厳密には、同位体分別効果は以下の式で求められる。

$$A_{ON} = 0.95\, A_{OX} (1 - 19/1000)^2 / (1 + \delta^{13}C_{PDB}/1000)^2, \quad (4)$$

ここでシュウ酸 I の $\delta^{13}C_{PDB}$ 値は–19.3‰であるため、式 3 による近似値の誤差は無視できるほど小さい（0.001%以下）。

現在シュウ酸 I はすでに枯渇しているため、シュウ酸 II の $^{14}C/^{12}C$ 比（A_{NOX}）を用いた場合には以下のように定義される（Stuiver, 1983）。

$$A_{ON} = 0.7459\, A_{NOX} [1 - \{2 (25 + \delta^{13}C_{VPDB}) / 1000\}], \quad (5)$$

厳密にはここでも同位体分別効果は次式で求められるが、シュウ酸 II の $\delta^{13}C_{VPDB}$ 値は–17.8‰であり、式 5 による近似値の誤差は約 0.02%と小さい。

$$A_{ON} = 0.7459\, A_{NOX} (1 - 25/1000)^2 / (1 + \delta^{13}C_{VPDB}/1000)^2, \quad (6)$$

シュウ酸標準物質に含まれる ^{14}C も放射壊変によって失われていくため、A_{ON} を 1950 年の値に換算したものを「現代」の絶対基準（A_{ABS}）とする（Stuiver & Polach, 1977）。

$$A_{ABS} = A_{ON}\, e^{\lambda(y - 1950)}, \quad (7)$$

ここで y は測定年（西暦）、λ は ^{14}C の壊変定数（1/8267 yr^{-1}）である。最終的に式 2 の A_{ST} に A_{ABS} を代入して、$\delta^{14}C$ を得る。

$^{14}C/^{12}C$ 比の一次標準物質は木材であるため、その $\delta^{13}C$ は−25‰とされている。一方、海水中 DIC の $\delta^{13}C$ は 0‰に近く、また海洋で生産された有機物のそれは−15‰前後である。各リザーバー間における放射壊変による ^{14}C の減少量、すなわち「年齢」を比較する場合、$\delta^{14}C$ を使用すると各リザーバーにおける同位体分別効果の相違が誤差の原因となってしまう。そこで、海水試料を含む地球化学的試料では $\delta^{13}C$ 値を用いて同位体分別効果が補正された $\Delta^{14}C$[‰] を用いることが多い。

$$\Delta^{14}C = (A_{SN} / A_{ABS} - 1) \times 1000, \quad (8)$$

ここで、A_{SN} は試料の $\delta^{13}C_{VPDB}$ を用いて A_{SA}（試料中の $^{14}C/^{12}C$ 比）の同位体分別効果を補正した値である。すなわち、

$$A_{SN} = A_{SA} [1 - \{2 (25 + \delta^{13}C_{VPDB}) / 1000\}], \quad (9)$$
$$A_{SN} = A_{SA} (1 - 25/1000)^2 / (1 + \delta^{13}C_{VPDB}/1000)^2. \quad (10)$$

式 9 は近似式であり、$\delta^{13}C_{VPDB}$ が–30‰から 5‰の範囲において、その誤差は–0.13%から 0.02%となる。近似式による誤差は試料の $\delta^{13}C_{VPDB}$ が–25‰から離れるほど大きくのなるため、海水試料の場合（$\delta^{13}C_{VPDB}$＝約 0 ‰）には式 10 を用いるほうが良い。

$\Delta^{14}C$ は、ある試料が木材と同じ $\delta^{13}C$ 値（–25‰）を持っていると仮定した時の $\delta^{14}C$ 値とみなすことができる。海水中 DIC の場合、$\Delta^{14}C$ と $\delta^{14}C$ には約 50 ‰の差がある。また、試料の採取された年（z）と測定された年（y）が異なる場合には、式 2 の A_{SA}、式 8 の A_{SN} は、それぞれ $A_{SA}\, e^{\lambda(y - z)}$,、$A_{SN}\, e^{\lambda(y - z)}$ に置き換えなければならない。

年代測定を目的とする考古学試料の測定では試料と標準物質の ^{14}C 放射壊変分が相殺されるため、式 2 の A_{ST}（$=A_{ABS}$）、式 8 の A_{ABS} の代わりに A_{ON} を用いる（Stuiver and Polach, 1977）。

$$d^{14}C = (A_{SA} / A_{ON} - 1) \times 1000, \quad (11)$$
$$D^{14}C = (A_{SN} / A_{ON} - 1) \times 1000. \quad (12)$$

これら $d^{14}C$ (‰)、$D^{14}C$ (‰)は、$\delta^{14}C$ 、$\Delta^{14}C$ と紛らわしいが、厳密に使い分ける必要がある。また、A_{SA} / A_{ON} を%で表したものを pMC（percent modern carbon）と呼ぶこともある。この節で説明した ^{14}C に関連する表記方法は、主に Stuiver and Polach (1977)を参考にした。これらの伝統的な表記方法に代わる新しい表記方法が Mook and van der Plicht (1999)などによって提案されているが、あまり普及していない。

3、試料採取

1 で述べたように本項では、海水中 DIC の $\delta^{13}C$ と$\Delta^{14}C$ を同時に分析する方法について記述する。海水試料の採取（3）と海水試料から CO_2 ガスを抽出・精製する操作（4）は、$\delta^{13}C$ と $\Delta^{14}C$ に共通である。

3-1、必要な器具と試薬

3-1-1、海水試料瓶

大気中 CO_2 ガスからの汚染を防ぐために、スクリュー蓋ではなく共擦栓のホウケイ酸ガラス瓶を使用する。以下では容量 250 mL の試料瓶を用いているが、500 mL のものを使用している研究グループもある（McNichol et al., 2010）。AMS 法による ^{14}C 測定に必要な炭素量は約 1 mg（＝約 80 μmol）、IRMS による $\delta^{13}C$ 測定に必要な炭素はさらにその 1/10 以下であるため、海水中 DIC 濃度を 2000 $\mu mol \cdot L^{-1}$ とすると予備を含めても必要とされる海水量は 100 mL で十分である。使用後の瓶はアセトンでグリースを拭き取り、アルカリ洗剤、10%塩酸で洗浄する。純水で濯いだ後、450℃の電気炉で一晩加熱し放冷する。各瓶には番号を付け、共擦栓とともにその重量を測定しておく（空重量測定）。

3-1-2、グリース

アピエゾングリース L、M、N が推奨される。容量 10 mL 程度のプラスチック製の注射器にグリースを移すと使い易い。

3-1-3、塩化水銀（II）飽和水溶液

特級グレードの塩化水銀（II）粉末約 10 g を、プラスチック容器中の約 100 mL 純水に添加する。塩化水銀（II）の常温（20℃）における溶解度は純水 100 mL に対して約 7 g であるので、容器の底には塩化水銀（II）粉末が溶け残る。塩化水銀（II）は非常に毒性が強いので、溶液および廃液の取り扱いには十分配慮しなければならない。

3-1-4、分注器

塩化水銀（II）飽和水溶液 50 μL を、海水試料に分注するためのピペットを用意する。また海水試料瓶にヘッドスペースを作るための、容量 10 mL 程度のピペットも準備する（3-2-2）。

3-1-5、キムワイプ等

グリースを塗布する前、試料瓶口と共擦栓に付着している海水を拭き取るためのキムワイプ等を準備する（3-2-2）。

3-2、採取手順

3-2-1、海水分取

採水器から試料瓶に海水試料を分取する方法は、本ガイドライン第 3 巻第 4 章に示された DIC 分析ための試料採取方法に準じる。炭素同位体試料測定用の海水試料は、一般的に DIC を含む炭酸系の項目に引き続いて採水されることが多い。

3-2-2、「固定」作業

海水試料の分取後、以下の要領で速やかに塩化水銀（II）飽和溶液を試料に添加し、生物活動による DIC 濃度の変化を防ぐ。これを試料の「固定」という。実験室に持ち帰った試料瓶の共擦栓を取り、栓に付いた海水をキムワイプ等で拭き取る。ピペットを使って、5~10 mL の海水試料を瓶から抜き取る。瓶口内壁に付着した海水を、キムワイプ等で拭き取る。次に塩化水銀（II）飽和溶液 50 µL を海水試料に添加する。共擦栓に適量のグリースを塗布して瓶に戻し、栓を回転させグリースをよくなじませる。この時、グリースが不十分だと気密性が保たれない。しかし、過剰なグリースは瓶口から瓶内へ落ち込み、それが原因でバブラー（4-7）が汚れてしまうので注意する。市販のクリップを使って、共擦栓と瓶本体をしっかり固定する。適当なクリップが無い場合、幅広の輪ゴムを利用してもよい。試料前処理に供されるまで海水試料は、冷暗所に保管する。

4、前処理 1 （CO_2 の抽出精製）

DIC の炭素同位体比を測定するためには、まず DIC を CO_2 ガスとして海水試料から抽出しなければならない。抽出方法には、試料に $SrCl_2$ や $BaCl_2$ を添加することで回収した炭酸塩に酸を添加して CO_2 を発生させる沈殿法（Drimmie et al., 1991）、海水試料に酸を加え pH を低下させることで試料中 CO_2 の溶解度を減少させた上で、高純度の N_2 などの不活性ガスを用いて試料中の CO_2 を脱気捕集するバブリング法（McNichol and Jones, 1992）、試料に酸を滴下して pH が低下することで発生する CO_2 を試料容器の上部空間から回収するヘッドスペース法（石井ら,2000; Salata et al., 2000）などがある。海水試料については、バブリング法が広く利用されている（McNichol et al., 2010）。本項では、国立研究開発法人国立環境研究所（National Institute for Environmental Studies, NIES）で使用されている抽出・精製用真空ラインと作業手順を具体例として挙げながらバブリング法を解説する。なお、ここでは手動による処理方法を述べるが、CO_2 ガスの抽出精製を自動化した装置も国内外にで製作されている（Aramaki et al.,

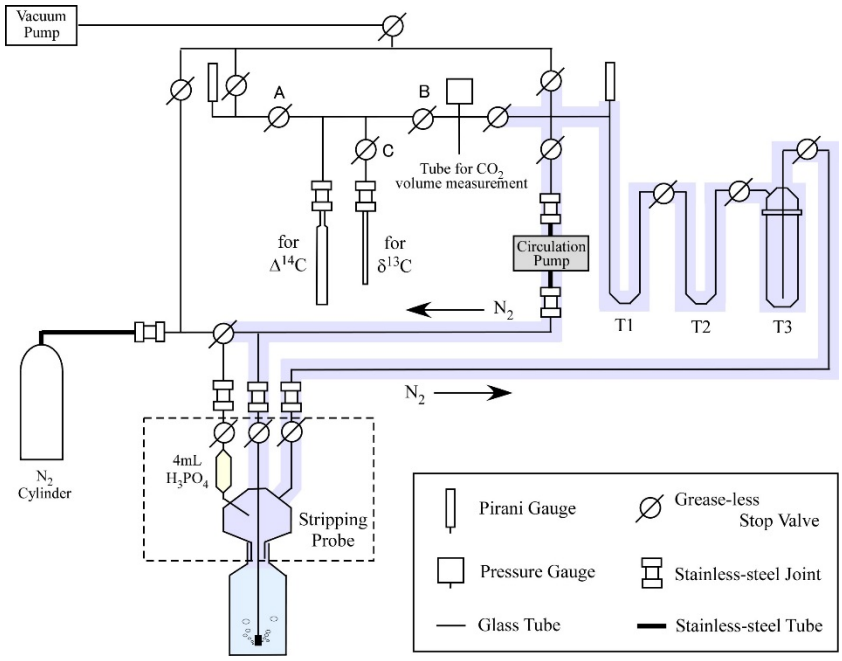

図 1　抽出・精製ラインの概略図

2000; 本多ら, 1999；McNichol and Jones, 1992）。

4-1、抽出・精製ライン

NIES の抽出・精製ラインの概略を図 1 に示した。これは真空ライン（真空度 0.1 Pa 以下）となっており一部の金属または樹脂製の部品を除き、ホウケイ酸ガラスを部材として使用している。これは加工が比較的容易であり継手を極力使用しないことで、真空ライン内が外気に触れる機会を減らし、ライン外からの CO_2 の混入を防ぐ狙いがある。ただし、近年は加工がさらに容易なステンレス管とステンレス製継手（Swagelok 社）を使用した真空ラインを利用している研究機関も多い。また、真空バルブはいずれもグリースレス・バルブ（（有）光信理化学製作所社）を採用している。これは実験ライン内へのグリースからの汚染を防ぐ狙いがあるが、試料瓶と抽出容器の擦り合わせ部分にはグリース（アピエゾン L、M、N 推奨）を使用せざるを得ない（4-2）。

4-2、海水試料準備

実験室に持ち帰った海水試料瓶の重量を測定する。その重量から試料採取前に事前に測定した空重量（3-1-1）を差し引くことで、瓶に採取された海水重量を求める。次に N_2 ガス雰囲気のグローブボックス内で、開栓して抽出容器（図 1 中では”Stripping Probe”と表記）を取り付ける。抽出容器にはあらかじめ 4 mL のリン酸溶液を入れておく。リン酸溶液は、NIES では Bowen（1966）によって提唱された精製法に従い、ピロリン酸を主体としてメタリン酸を少量含む混合溶液（100%リン酸液）を使用している（市販されている 85%の濃リン酸溶液を使用してもよい）。

4-3、抽出容器の取り付け

抽出容器の 3 つの真空バルブが閉じていることを確認してグローブボックスから試料瓶＋抽出容器（図 2）を取り出し、ステンレス製継手を介して真空ラインに接続後ライン全体を十分に排気する。

4-4、窒素ガスの充填

圧力計（Pressure Guage）の値を参考に、N_2 ガス・ボンベ（99.9999%以上の高純度ガス推奨）より真空ライン全体に N_2 ガスを 1 気圧強になるまで充填する。

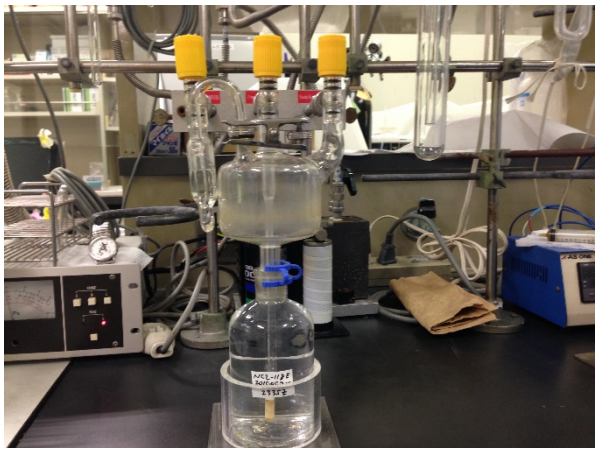

図 2　試料瓶＋抽出容器

4-5、循環流路の切り離し

バルブを操作し、N_2 ガスの循環流路（図 1 で網掛けした部分）を隔離する。ただし、抽出容器の 3 つの真空バルブは、この時点では閉じたままにしておく。

4-6、リン酸注入

抽出容器のリン酸溶液の上にある真空バルブを開くと、真空ラインと試料瓶の間の気圧差によってリン酸溶液が試料瓶内に注がれる。この操作によって、海水試料中の pH が低下して試料内の DIC が CO_2 となる。

4-7、窒素ガスの循環

リン酸溶液が試料瓶内にすべて注入されたらその上にある真空バルブを閉じ、抽出容器の他の 2 つの真空バルブを開くとともに循環ポンプの電源を入れる。図 1 で網掛けした循環流路を図中の矢印の方向に N_2 ガスが循環を始め、試料瓶に挿入されたバブラーから気泡が放出される。N_2 ガスの循環速度が速すぎると、海水試料が抽出容器から溢れて真空ラインが海水試料で汚染されてしまう。通常この循環速度は、0.5～1.0 リットル/分程度が適当である。図 1 のラインにおいて 250mL の海水試料を処理した場合、CO_2 を完全に回収するためには約 10 分の循環時間を要する。テスト試料を用いて、95%以上の CO_2 回収率（4-10）を得ることができる N_2 ガスの循環速度・時間を予め見積もっておく必要がある。

4-8、冷却トラップ

N_2 ガスの循環中、トラップ 1（T1）及びトラップ 2（T2）の内部が−196°C、トラップ 3（T3）は−72°C になるように外側から、それぞれ寒剤として液体窒素、ドライアイス・エタノールを用いて冷却する。この操作によって、海水試料中の CO_2 と水分などが T1 及び T2 に、大部分の水分は T3 に、それぞれ捕集される。

4-9、窒素ガスの廃棄

約 10 分後、循環ポンプの電源を落とすとともに T3 のドライアイス・エタノールを取り除き、真空ライン全体を十分に排気する。

4-10、CO_2 の回収

T1 及び T2 の寒剤を液体窒素からドライアイス・エタノールに替えることで、そこに捕集された CO_2 のみを圧力計の下部にある定容管（あらかじめ容積が求められているガラス管）に移動させる（この時、定容管は液体窒素で冷却）。これを「精製」という。次に液体窒素を取り除き、定容管内に拡散した CO_2 の圧力を圧力計（Pressure Gauge）で測定する。その圧力、ライン内温度（＝室温）、定容管体積から、気体の状態方程式を用いて回収された CO_2 量（モル）を算出する。一方、別途測定した DIC 濃度と海水試料重量（4-2）から、試料中に含まれる CO_2 量を計算する。それを 100%として抽出・精製された CO_2 の回収率を求める。試料処理中の同位体分別効果を小さくするため、この回収率は 95%以上であることが求められる（McNichol and Jones, 1992）。

4-11、CO_2 の保管

回収された CO_2 は、液体窒素及びバルブ操作によって$\Delta^{14}C$ 用及び $\delta^{13}C$ 用のガラス管（外

径 6mm あるいは 9mm のホウケイ酸ガラス管）にそれぞれ封入して保存する（保管用のガスを同じくガラス管に保存することもある）。具体的には、液体窒素を使って CO_2 ガスを定容管から$\Delta^{14}C$ 用（もしくは $\delta^{13}C$ 用）ガラス管に移動させた後、図 1 の真空バルブ A と B を閉じる（C は開）。次に液体窒素を取り除き、真空バルブ A と B で閉鎖された区画に CO_2 ガスを拡散させる。$\delta^{13}C$ 用のガラス管直上の真空バルブ C を閉じ、その下に分離された CO_2 ガスを液体窒素を使って $\delta^{13}C$ 用ガラス管下部に集める。ガスバーナーでガラス管上部を溶融させ、その内部に CO_2 ガスを封じる。さらに、真空バルブ A、B、C で閉鎖された区画に残った CO_2 ガスを同じく液体窒素、ガスバーナーを使って、$\Delta^{14}C$ 用のガラス管に封ずる。図 1 に示した NIES の真空ラインで分岐操作を行うと、$\Delta^{14}C$ 用と $\delta^{13}C$ 用の CO_2 ガスは約 4 : 1 の体積比に分割される。これは海水試料 250 mL に含まれる溶存無機炭素を 500 µmol とした時に、それぞれ 400 µmol と 100 µmol に相当する。この体積比は CO_2 ガスを拡散させるガラスラインの体積に依存するので、事前にそれらの体積比を求めておく必要がある。$\Delta^{14}C$ 分析用のガスは、次の 5 で述べるようにさらにグラファイト化処理を施される。一方 $\delta^{13}C$ 分析用のガスは、そのまま IRMS による分析に供される（6-1）。なお、ガラス管中の CO_2 ガスは、半永久的に安定である。

4-12、分岐時の同位体分別

4-11 において CO_2 ガスを閉鎖区画内に拡散させる時間が短いと、分岐された CO_2 ガスに同位体分別が起こり誤差の原因となる。図 1 に示したラインでは、経験的に 5 分以上の拡散時間が必要であることがわかっている。しかし、この時間は個々の真空ラインの形状、体積に依存するため、テスト試料を使って各分岐ガス（$\Delta^{14}C$ と $\delta^{13}C$ 用）の $\delta^{13}C$ を測定し、同位体分別を生じさせないために必要な拡散時間を見積もっておかなければならない。

5、前処理２（CO_2 のグラファイト化）

AMS を用いて ^{14}C 測定を行うためには、海水から抽出した CO_2 ガスを還元して固体状炭素を得る必要がある。CO_2 ガスの還元方法としては、1) マグネシウムを用いてアモルファス（非晶質）の炭素に還元する（吉川ら, 1987）、2) CO_2 を金属リチウムと反応させてアセチレンを合成したのち交流電圧で分解してアルミニウム電極上にグラファイトを形成する（Gurfinkel, 1987）、3) 鉄を触媒として水素で CO_2 をグラファイトに還元する（Vogel et al., 1984）、などが報告されている。1) の方法は湿式処理が必要なため現代炭素混入の可能性が高く、また得られるアモルファス炭素には電気伝導性がないため銀などの金属と混合する必要があり（AMS による計測では電気伝導性が必要）、微量の CO_2 ガスの処理方法としては適当ではない。2) 及び 3) の方法はいずれも AMS 測定に適した電気伝導性をもつグラファイトが作製できるが、作業の簡素化と回収率の向上の利点から 3) の方法が最も一般的となっている。本項では、 NIES で使用されているグラファイト調製用真空ラインと作業手順を具体例として挙げながら、3) を改良した Kitagawa et al. (1993)による方法を紹介する。

5-1、グラファイトライン

NIES のグラファイトラインの概略を図 3 に示した。これは真空ラインとなっており、4 で

紹介した CO_2 の抽出精製ラインと同様に、一部の金属または樹脂製の部品を除いてホウケイ酸ガラスを部材として製作されている。

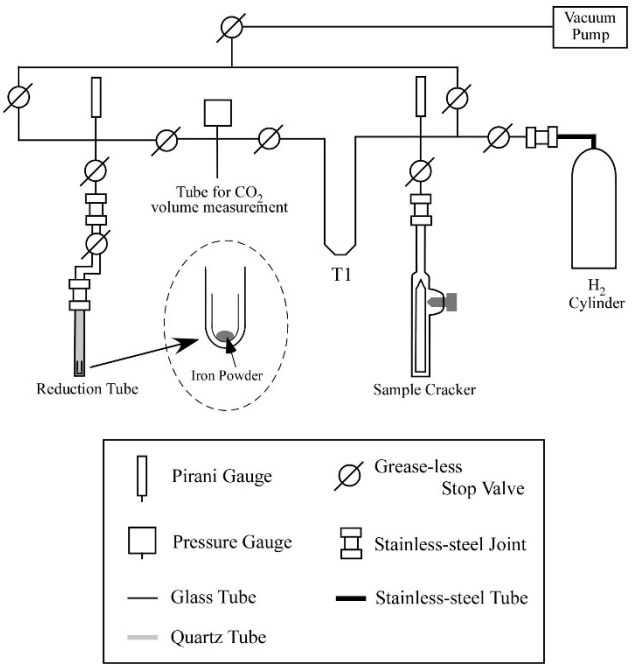

図 3　グラファイトラインの概略図

5-2、鉄触媒の準備

還元反応の触媒として使用する鉄粉末を準備する。その粒径は、できるだけ細かいものがよいとされる（NIES では粒径 10 μm 以下のものを使用）。市販の鉄粉末には粉末化の際に用いられる有機物が付着している可能性がある。また保存中に表面が酸化されていることもある。そのため、事前に水素ガス雰囲気下 650°C で 1 時間加熱処理することで、付着した有機物の分解と還元を行う（プレ還元）。このプレ還元の作業は、CO_2 ガスが無い状態で、下記の 5-9 と 5-10 の操作に準じて実施される。

5-3、鉄触媒の量比

鉄粉末量は、還元反応によって生成すると期待されるグラファイト量との重量比が 1 : 1 程度（Kitagawa et al., 1993）となるように計量する。しかしながら、生成するグラファイト量が 1 mg 以下となるような微少量の場合は、鉄粉末量を 2 倍量程度まで増やすことでグラファイトの回収率が向上することが経験的に分かっている。

5-4、鉄触媒の秤量

長さ 2cm 程度・外径 6mm（内径 4 ㎜）の石英管の空重量を測定し、それに 5-3 で決められた量の鉄粉末を入れ重量を測定する。鉄粉末をこぼさないように、それを還元反応管（図 3 中では Reduction Tube と表記）と呼ぶ外径 9mm の石英管の中に入れる。なお、反応管の材料

として石英を選択したのは、後述するように還元反応を 650°C の高温で行うためである（5-10）。

5-5、CO_2 ガスの準備

試料 CO_2 ガスが封入されたガラス管（4-11）をサンプル・クラッカー（図 3 中では Sample Cracker と表記）に入れる。その後、ステンレス製継手を介してサンプル・クラッカー及び還元反応管を真空ラインに接続してライン全体を十分に排気する。サンプル・クラッカーとは、真空中で CO_2 ガスが封入されたガラス管を割るための実験器具のことである。NIES ではホウケイ酸ガラスとグリースレス・バルブを組み合わせた自家製のものを使用している（図 4）。

図 4　サンプル・クラッカー

5-6、CO_2 ガスの導入

サンプル･クラッカーによってガラス管を割ることで試料 CO_2 ガスを真空に引かれたグラファイトラインに導入し､−196°C になるように外側から液体窒素で冷却したトラップ 1（T1）で捕集する。

5-7、CO_2 ガスの定量

寒剤（液体窒素とドライアイス・エタノール）及びバルブ操作によって T1 の CO_2 ガスを精製し、圧力計の下部にある定容管（あらかじめ容積が求められているガラス管）に移動させる（この時、定容管は液体窒素で冷却）。次に液体窒素を取り除き、定容管内に拡散した CO_2 の圧力を圧力計（Pressure Gauge）で測定する。その圧力、ライン内温度（＝室温）、定容管の体積から、回収された CO_2 量（モル）を気体の状態方程式を用いて算出する。

5-8、水素ガス量

CO_2 ガスと水素（H_2）ガスの反応は以下の式で表される。

$$CO_2 + 2H_2 \rightarrow C + 2H_2O. \quad (13)$$

したがって、5-7 で得られた CO_2 ガスをグラファイトに還元するためには、その 2 倍量の H_2 ガスが必要となる。経験的に若干の過剰量となる 2.1〜2.2 倍量の H_2 ガスを導入することで、グラファイトの回収率が高くなることが報告されている（Kitagawa et al., 1993）。

5-9、水素ガスの充填

液体窒素を使って、CO_2 ガスを定容管から還元反応管の下部に移動させる。この還元反応

管と接続する真空バルブ（図 5）の内容積を、あらかじめ測定しておく。CO_2 ガスを還元反応管下部に保持しながら、H_2 ガス（99.9999%以上の高純度のものが推奨される）をグラファイトラインに導入する。H_2 の融点及び沸点はともに−250°C 以下であり液体窒素温度でも捕集されないため、この操作によってライン内全体に H_2 ガスが充填されることになる。充填する H_2 ガスの圧力は定容管上部に設置した圧力計で測定する。その圧力は、CO_2 量（5-7）と還元反応管＋真空バルブの内容積から計算される、常温におけるその内部の CO_2 圧力の 2.1〜2.2 倍とする。H_2 ガスを充填したら還元反応管上部の真空バルブを閉じて、液体窒素を取り外す。この時、常温における還元反応管＋真空バルブ内の CO_2＋H_2 ガスの圧力の合計が 2 気圧を超えると、還元反応管と真空バルブを繋ぐ継手（図 5）が外れてしまうことがある。NIES では還元反応管＋真空バルブの内容積は 20mL 以上のものを用い、その内部の CO_2＋H_2 ガス圧力が 1.5 気圧を超えないようにしている（例えば、常温下では 400μmol の CO_2 の 20mL 容器内での圧力は約 0.5 気圧となり、これに H_2 ガス約 1 気圧を加えると全圧は約 1.5 気圧となる）。

5-10、グラファイト調製

還元反応管を真空ラインから切り離し、還元反応管下部を電気炉に入れ、650°C で 6〜12 時間程度加熱して試料 CO_2 ガスをグラファイトに還元する。この電気炉は、直径 9mm の還元反応管下部を差し込むことできるように、直径 10 ㎜程度の炉口を持つ直管型のものを使用する。複数の試料を同時に処理するために、複数の電気炉（もしくは複数の炉口）を準備することが推奨される。電気炉での加熱時、還元反応管上部をペルチェ素子や寒剤によって冷却することで、還元反応（式 13）によって発生する水分を反応管上部に隔離する。冷却しない場合でも、反応管上部内壁には水滴が付着するが、冷却によって積極的に水分を分離することで、反応を促進し反応時間を短縮することができる（荒巻ら, 1999）。還元反応管（図 5）に L 字型の加工が施してあるのは、水分を反応管下部へ環流させないための工夫である。

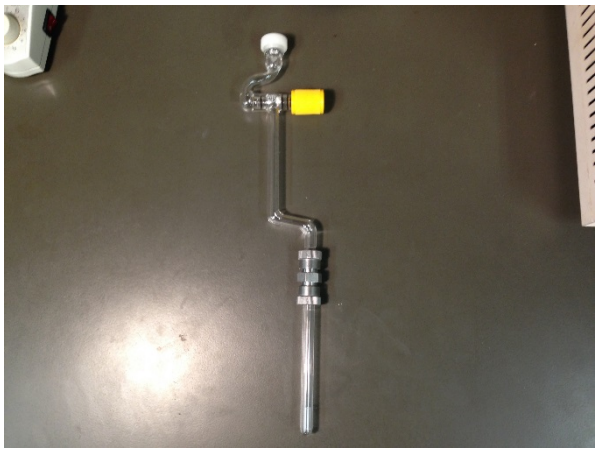

図 5　還元反応管

5-11、グラファイトの重量測定

回収されたグラファイトと鉄触媒の混合物（と石英管）の重量を測定する。あらかじめ測定された石英管の空重量と鉄触媒の重量（5-4）を差し引くことで、グラファイトの重量を求める。グラファイトとして回収された CO_2 量を計算し、反応に供した CO_2 量（5-7）に対する回収率を求める。通常このグラファイト回収率は 70~90%程度の値が得られる。回収率が 60%よりも低い試料については、グラファイト化の過程で同位体分別が起こっている可能性があるため、得られた$\Delta^{14}C$ 値に注意する必要がある（Kitagawa et al., 1993）。

6、分析

6-1、$\delta^{13}C$

6-1-1、標準ガス

デュアルインレット方式 IRMS で $\delta^{13}C$ を測定するためには、$\delta^{13}C$ 値が既知の CO_2 ガス、すなわち標準ガスが必要である。IAEA から炭酸カルシウムの標準物質（2-1）が配布されているので、なるべく海水試料の $\delta^{13}C$ 値に近い値を持つ標準物質から CO_2 ガスを得る（海水試料の分析には $\delta^{13}C_{VPDB}$ = 1.95 ‰である NBS19 が理想的であったがすでに在庫がない）。具体的には、Bowen（1966）の方法によって調製した 100％リン酸液（4-2）と標準物質（炭酸カルシウム）を、25℃の恒温槽中の真空容器内で反応させる（反応時間はサンプル量に依存する）。発生した CO_2 ガスを真空ラインに導入し、液体窒素とドライアイス・エタノールを使って精製する。精製された CO_2 ガスは、グリースコック付のガラス容器に保管する。これは、$\delta^{13}C$ だけでなく酸素の安定同位体比 $\delta^{18}O$ も正しく得るための操作手順である。一方、米国オズテック（Oztech）社から、$\delta^{13}C_{VPDB}$ 値が与えられた標準ガスが供給されているので、これらのガスを使用すれば標準物質をガス化する手間を省くことができる。

6-1-2、CO_2 ガスの導入

IRMS のスタンダード・インレット部に標準ガスの入ったガラス容器を接続し、標準ガスを IRMS に導入する。ガラス管に封入された試料ガス（4-11）を IRMS に導入するためには、サンプル・クラッカー（5-5）と同じ原理の「手動ブレーカー」を準備して IRMS のサンプル・インレット部に装着しなければならない。IRMS にはオプション装置として、試料ガスが封入されたガラス管を割る自動ブレーカーが準備されている。自動ブレーカーが装備された IRMS の場合には、それに試料ガスが封入されたガラス管を取り付ける。試料ガス、標準ガスの導入の際には、同位体分別が起きないようにそれぞれの拡散時間（通常は数分）を十分に取る必要がある（事前にテスト試料を使って確認しておく）。

6-1-3、測定と不確かさ

測定は、プログラムによって試料ガスと標準ガスの測定が交互に、自動的に行われる。測定に用いた標準ガスの $\delta^{13}C$ 値は、予めプログラムに入力しておく。測定結果は、導入された試料ガスを複数回（5 回程度）測定した結果（平均値と標準偏差）として出力される。しかしここで得られる「標準偏差」は同じ試料ガスの繰り返し測定の精度しか表していない。同じ海水試料を 2 個のペアで採取し得られた結果の差を複数のペアで比較したところ（replicate sampling）、約 0.03‰という標準不確かさが求められている（McNichol et al., 2010）。この不確かさには、IRMS 分析だけでなく、試料採取、試料前処理に起因する不確かさも含まれている。

6-2、$\Delta^{14}C$

AMS 法は、通常の質量分析の構成（イオン源、質量分析系、検出器）に加速器によるイオンの加速部分を加えたものである。ここでは、オランダの High Voltage Engineering Europe (HVEE) 社製のタンデトロン AMS を例に挙げて説明する（図 6）。同型の AMS は、米国ウッズホール海洋研究所のほか、国内では名古屋大学や日本原子力研究開発機に設置されている。

6-2-1 、標準物質

AMS による$\Delta^{14}C$ 測定では、IRMS による $\delta^{13}C$ 測定の場合と同じく、試料と標準物質を同時に計測する。標準物質である NIST シュウ酸 II（2-2）を CO_2 にガス化するためには、通常燃焼法が用いられる。長さ約 7cm、外径 6mm（内径 4 ㎜）のホウケイ酸ガラス管に、シュウ酸 II 約 5mg（これはグラファイト約 1mg に相当する）、酸化銅約 1g を詰める。それを、還元銅約 0.5g、銀片約 1mg（銀は妨害ガスと反応してその発生を抑える）といっしょに外径 9mm（内径 7 ㎜）のホウケイ酸ガラス管に挿入する。それを継手を使って真空ラインに装着し管内を真空引きした後、ガラス管上部をガスバーナーで封じる。封管されたガラス管を電気炉に入れ、550℃で 8 時間加熱する。燃焼が成功すると、シュウ酸が CO_2 に酸化され酸化銅の一部が還元される。ガラス管に亀裂が発生していると、還元銅がすべて酸化され黒く変色していることでわかる。ガラス管を室温まで冷却した後、管内に生成した CO_2 を 5-5、5-6、5-7、4-11 に準じる操作で精製し、外径 6mm のガラス管に封入する。標準物質から得られた CO_2 ガスのグラファイト化は、必ず試料をグラファイト化した真空ラインを用い、同じ操作で行わなければならない。グラファイト化された標準物質は、その品質が AMS 測定結果に大きく影響するため、測定毎の比較可能性（comparability）を確認しなければならない。具体的には、IAEA から配布されている ^{14}C 参照物質である IAEA-C7（Oxalic Acid, pMC=49.53%）も合わせて CO_2 ガス化・グラファイト化を実施し、シュウ酸 II のグラファイトと同時に AMS 測定に供することで、両者の比が変動していないことを測定毎に確認する。過去の AMS 測定で使用したシュウ酸 II のグラファイトを新しく調製されたものと同時に測定し、それらの値を比較することも有効である。AMS 測定の品質管理の詳細については、他の解説を参照されたい（例えば Tuniz et al., 1998; 中村, 2003）。

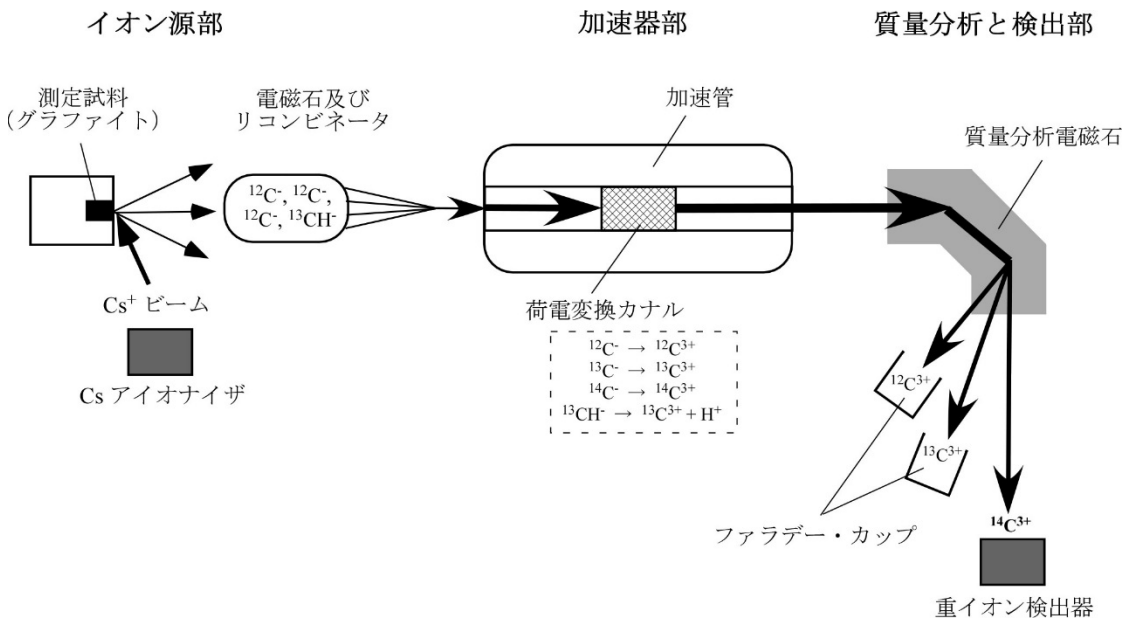

図 9-6　タンデトロン AMS の概略図

6-2-2 、ターゲットプレス

CO_2 ガスから得られたグラファイト粉末試料（5-11）は、速やかに AMS 分析に供することが望ましいが、保管する場合には大気中酸素と鉄触媒が反応しないように、窒素雰囲気下、もしくは真空中に置く。グラファイト試料を AMS で測定するためには、ターゲット呼ばれる専用のサンプルホルダーに、高い圧力をかけることでグラファイト試料を装填しなければならない。これをターゲットプレス作業というが、具体的なプレス圧力は個々の AMS 施設で経験的に定められているようである。プレス作業時には、各試料間で汚染が起きないように注意を払わなければならない。

6-2-3、イオン源

グラファイト試料から炭素ビームを引き出すイオン源としては、セシウム・スパッター型の固体イオン源（Cs アイオナイザ）が一般的である。ターゲットに装填されたグラファイト試料はイオン源に装着され、セシウム・イオンのスパッタリング（sputtering）によってそこから炭素の 1 価の負イオンビーム（$^{12}C^-$、$^{13}C^-$、$^{14}C^-$、$^{13}CH^-$など）が引き出される。なお、炭素は電子親和力が正である（負イオンを形成しやすい）のに対して窒素は電子親和力が負であるため、負イオン源においては窒素の妨害イオンが形成されにくいという利点がある。

6-2-4、ビーム入射

イオン源から引き出された負イオンは、複数の電磁石を通過することで質量（12、13 及び 14）に応じて軌道分離され、不要イオンが除去される。その後リコンビネータによって 3 質量のビームは 1 つに収束され、加速器に入射される。

6-2-5、タンデム加速

加速器に入射した負イオンは、正に荷電した加速管中央部の高電圧ターミナルに向けて加速される。さらに荷電変換カナルを通過する際に、その内部に封入されているアルゴンガスと衝突することにより電子を剥ぎ取られて正イオンに変換され、加速器後半部で再加速される（「タンデム（tandem）」の名称はこの 2 段階加速に由来する）。また荷電変換カナルで同重体の妨害イオンを破壊することで、分析精度の向上が図られている。

6-2-6、検出器

加速器から放出された正イオンは、質量分析電磁石によって質量分離される。^{12}C 及び ^{13}C はファラデー・カップ（帯電した粒子を真空中で捕捉する装置）によって電流測定され、^{14}C は重イオン検出器によって計数される。なお、AMS 法による ^{14}C の検出効率は 1%程度と言われている。各計測値から $^{14}C/^{12}C$ 比と $^{13}C/^{12}C$ 比が求められる。

6-2-7、測定の不確かさ

得られた $^{14}C/^{12}C$ 比と $^{13}C/^{12}C$ 比から、$\Delta^{14}C$ を計算する方法については 2-2 で説明した。$^{13}C/^{12}C$ 比については、CO_2 ガスを IRMS で測定した値（6-1）を用いるのではなく、AMS で測定された $^{13}C/^{12}C$ 比を使うほうが良いとされる（中村, 2003）。これは、グラファイト化処理と AMS 測定における同位体分別効果も含めて補正されるためであるが、一般的に AMS で測定された $^{13}C/^{12}C$ 比は、IRMS で測定された値よりも不確かさが大きい。$\Delta^{14}C$ を報告する際には $\delta^{13}C$ の測定方法も明記するべきである。$\Delta^{14}C$ の不確かさは、一般的に ^{14}C の計数に依存する

不確かさ（計数値が大きいほど不確かさは小さくなる）と繰り返し測定から見積もられた不確かさを合成して求められる。同じ海水試料を 2 個のペアで採取し得られた結果の差を複数のペアで比較したところ（replicate sampling）、その標準不確かさとして約 5‰という値が報告されている（Aramaki et al., 2010; Kumamoto et al, 2013; McNichol et al., 2010）。この不確かさには、AMS 分析だけでなく、試料採取、試料前処理に起因する不確かさも含まれている。

6-2-8、外来炭素による汚染

AMS 測定におけるブランク（外来炭素による汚染）は、通常鉄粉末（5-2）だけをターゲットにプレスしたものを測定して評価される。一方、前処理時における試料の汚染については、^{14}C-free の海水を調製することが難しいため、CO_2 ガスの抽出精製作業（4）における汚染の評価は困難である。グラファイト化作業（5）における汚染は、IAEA から配布されている ^{14}C 参照物質である IAEA-C1（Carbonate, pMC=0.00%）を酸と反応させて得られた CO_2 ガス（ここでは $\delta^{18}O$ を考慮する必要がないので、6-1-1 の場合と異なり酸の種類、反応温度は問わない）をグラファイト化し、その AMS 測定結果から求める方法が一般的である。

引用文献

Anderson, E. C., W. F. Libby, S. Weinhouse, A. R. Reid, A. D. Kirshenbaum, and A. V. Grosse (1947): Radiocarbon from cosmic radiation. Science, 105, 576–577.

荒巻能史 (1999): AMS による海水中の放射性炭素測定のための化学的前処理法. 日本原子力研究所調査研究報告 99-007, pp.22.

Aramaki, T., T. Mizushima, Y. Mizutani, T. Yamatoto, O. Togawa, S. Kabuto, T. Kuji, A. Gottdang, M. Klein and D.J.W. Mous (2000): The AMS facility at the Japan Atomic Energy Research Institute (JAERI). Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B172, 18-23.

Aramaki T, Y. Nojiri, H. Mukai, S. Kushibashi, M. Uchida, and Y. Shibata (2010): Preliminary results of radiocarbon monitoring in the surface waters of the North Pacific. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 268, 1222–1225.

Becker, M., N. Andersen, B. Fiedler, P. Fietzek, A. Körtzinger, T. Steinhoff, and G. Friedrichs (2012): Using cavity ringdown spectroscopy for continuous monitoring of $\delta^{13}C(CO_2)$ and fCO_2 in the surface ocean. Limnology and Oceanography: Methods, 10, 752–766.

Bowen, R (1966) : Paleotemperature analysis. Elsevier Publ. Co., Amsterdam, pp.265.

Drimmie, R. J., R. Aravena, L. I. Wassenaar, P. Fritz, M. J. Hendry, G. Hut (1991): Radiocarbon and stable isotopes in water and dissolved constituents, Milk River aquifer, Alberta, Canada. Applied Geochemistry, 6, 381–392.

Gamo, T. and Y. Horibe (1983): Abyssal circulation in the Japan Sea. Journal of Oceanographical Society of Japan, 39, 220–230.

Gurfinkel, D. M. (1987): An assessment of laboratory contamination at the Isotrace Radiocarbon Facility. Radiocarbon, 29, 335-346.

本多牧生, 熊本雄一郎, 原田尚美, 日下部正志, 片桐政信, 中尾清隆, 林一宏, 氣仙憲之 (1999): 海水中放射性炭素測定のための準自動化海水前処理装置. 海洋科学技術センター試験研究報告, 39, 1–16.

石井雅男, 吉川久幸, 松枝秀和 (2000): 電量滴定法による海水中の全炭酸濃度の高精度分析および大気中の二酸化炭素と海水中の全炭酸の放射性炭素同位体比の測定. 気象研究所技術報告, 41, pp.62.

Karlén I., I. U. Olsson, P. Kållberg, S. Killiççi (1966). Absolute determination of the activity of two ^{14}C dating standards. Arkiv for Geofysik, 6, 465–471.

Key, R. M., A. Kozyr, C. L. Sabine, K. Lee, R. Wanninkhof, J. L. Bullister, R. A. Feely, F. J. Millero, C. Mordy, and T.-H. Peng (2004): A global ocean carbon climatology: Results from Global Data Analysis Project (GLODAP). Global Biogeochemical Cycles, 18, GB4031, doi:10.1029/2004GB002247.

Kitagawa, H., T. Masuzawa, T. Nakamura, and E. Matsumoto (1993): A batch preparation method for graphite targets with low background for AMS ^{14}C measurements. Radiocarbon, 35, 295–300.

Kumamoto, Y., A. Murata, T. Kawano, A. Watanabe, and M. Fukasawa (2013) Decadal changes in bomb-produced radiocarbon in the Pacific Ocean from the 1990s to 2000s. Radiocarbon, 55, 1641–1650.

Libby, W. F., E. C. Anderson, and J. R. Arnold (1949): Age determination by radiocarbon content: world-wide assay of natural radiocarbon. Science, 109, 227–228.

Linick, T. W. (1978): La Jolla measurements of radiocarbon in the oceans. Radiocarbon, 20, 333-359.

Mckinney, C. R., J. M. McCrea, S. Epstein, H. A. Allen, and H. C. Urey (1950): Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotopic abundance ratios. the Review of Scientific Instruments, 21, 724–730.

McNichol, A. P. and G. A. Jones (1992): Measuring ^{14}C in seawater ΣCO_2 by accelerator mass spectrometry. In WOCE Operations Manual, Part 3.1.3 : WHP Operations and Methods, WHP Office Report WHPO 91-1, WOCE Report No. 68/91. Available online at: http://www.nodc.noaa.gov/woce/woce_v3/wocedata_1/whp/manuals.htm.

McNichol, A. P., P. D. Quay, A. R. Gagnon, and J. R. Burton1 (2010): Collection and measurement of carbon isotopes in seawater DIC. edited by E. M. Hood, C. L. Sabine, and B. M. Sloyan, ICPO Publication Series Number 134. Available online at: http://www.go-ship.org/HydroMan.html.

Mook., W. G. and J. van der Plicht (1999): Reporting ^{14}C activities and concentrations. Radiocarbon, 41, 227–239.

Muller, R. A (1977): Radioisotope dating with a cyclotron. Science, 196, 489–494.

中村俊夫 (2003): I.加速器質量分析（AMS）による環境中およびトレーサ放射性同位体の高感度測定. RADIOISOTOPES, 52, 145–171.

小熊幸子, 小埜恒夫, 東屋知範 (2012): 連続フロー型前処理装置 GasBench II を用いた海水の炭素・酸素安定同位体存在比（$\delta^{13}C_{DIC}$・$\delta^{18}O_{H2O}$）測定. 水産技術, 4, 65–71.

Östlund, G. H. and M. Stuiver (1980): GEOSECS Pacific radiocarbon. Radiocarbon, 22, 25-53.

Purser, K.H. (1977): Ultra-sensitive spectrometer for making mass and elemental analyses. United States patent, 4037100.

Salata, G. G., L. A. Roelke, L. A. Cifuentes (2000): A rapid and precise method for measuring stable carbon isotope ratios of dissolved inorganic carbon. Marine Chemistry, 69**,** 153–161.

Stuiver, M. (1983): International agreements and the use of the new oxalic acid standard. Radiocarbon, 25, 793–795.

Stuiver, M. and G. H. Östlund (1980): GEOSECS Atlantic radiocarbon. Radiocarbon, 22, 1–24.

Stuiver, M. and G. H. Östlund (1983): GEOSECS Indian Ocean and Mediterranean. Radiocarbon, 25, 1–29.

Stuiver, M. and H. A. Polach (1977): Discussion: Reporting of ^{14}C data. Radiocarbon, 19, 355–363.

Tsunogai S., S. Watanabe, M. Honda, and T. Aramaki (1995): North Pacific Intermediate Water studied chiefly with radiocarbon. Journal of Oceanography, 51, 519–536.

Tuniz, C., W. Kutschera, D. Fink, G. F. Herzog, J. R. Bird (1998): Accelerator Mass Spectrometry: Ultrasensitive Analysis for Global Science 1st Edition. CRC Press, Boca Raton, pp.400.

Vogel, J. S., D. E. Nelson, and J. R. Southon (1984): Performance of catalytically condensed carbon for use in accelerator mass spectrometry. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 233, 289–293.

吉川英樹, 佐藤和宏, 吉田邦夫, 小林鉱一, 三浦太一, 今村峰雄, 本間義夫, 中原弘道, 野崎正(1987): 炭素-14 加速器質量分析用試料作製時における現代炭素の混入. 分析化学, 36, 755–759.

DOC/DON/DOP

○小川　浩史（東京大学大気海洋研究所）

1、はじめに

本章では、海水中の溶存態有機物（Dissolved Organic Matter: DOM）を構成する主要 3 生元素、溶存態有機炭素（Dissolved Organic Carbon: DOC）、溶存態有機窒素（Dissolved Organic Nitrogen: DON）、溶存態有機リン（Dissolved Organic Phosphorus: DOP）の分析方法について取り扱う。測定対象試料は、基本的に外洋水から沿岸水までを含むが、特に対象試料の性質によって特別な注意が必要な場合には、その都度解説を加える。

一般に行われている海水試料中の DOM のバルクの元素分析は、有機物を酸化分解し、無機態の炭素、窒素、リンとして測定するものであり、有機物中の元素を直接測定する手法は開発されていない。従って、測定試料中に、元々無機態として存在している各元素が DOM と共存している場合、実際にはそれらの合計量を測定することになるため、別途、無機態の各元素量を測定し、最終的に差し引きによって DOM 中の各元素量を求めなくてはならない。幸い、DOC に関しては、海水中にその数十倍以上の濃度で溶存態無機炭素（Dissolved Inorganic Carbon: DIC）が共存しているにも関わらず、DIC は、海水試料を酸性化して曝気するという、極めて単純な前処理によって試料中から 100%除去することが可能なため、差し引きすることなく DOC を直接測定する事ができる。一方、DON と DOP の測定に関しては、溶存無機態（それぞれ、Dissolved Inorganic Nitrogen: DIN, Dissolved Inorganic Phosphorus: DIP）が共存する場合、それらを選択的に 100 %除去する前処理法が確立されていないため、先述したとおり、全量（それぞれ、Total　Dissolved Nitrogen: TDN、Total Dissolved Phosphorus: TDP）を測定し、別途測定した DIN および DIP 濃度を差し引く、すなわち、DON＝TDN－DIN、DOP＝TDP－DIP として求めることになる。外洋の中低緯度域の表層に代表されるような貧栄養海域では、DIN、DIP 濃度は極めて低く保たれているため、実質的に TDN≒DON、TDP≒DOP となり、比較的精度の高いデータを得やすい。一方、外洋の中深層の海水や、富栄養化、汚濁が進行した沿岸、内湾、河口域等における試料に関しては、しばしば、TDN≒DIN、TDP≒DIP に近い状況になる場合があり、精度以前に、DON と DOP の濃度を差分として求めることが困難になる。一例を挙げると、北太平洋中深層水の DIN（大部分は硝酸態窒素）濃度は 40-45 μM 付近であるのに対し、著者の経験から DON 濃度はおよそ 2 μM 程度である。つまり TDN 中にわずか 4-5%しか含まれていない DON を差し引きによって求めていることになる。仮に、この DON の値の信頼性を誤差±5 %程度（±0.1 μM）で得ようとすると、TDN と DIN の分析精度はそれぞれおよそ±0.3 %以下でなくてはならない（詳しくは、小川（2010））。一方、富栄養化した海域の代表例として、東京湾の河口域では、TDN 濃度がしばしば数百μM 以上に達するが、その中に占める DON の割合は 5-10 %程度にしか過ぎない。さらに、残りの大部分を占める DIN は、硝酸態窒素の他に、分析上取扱いに注意が必要なアンモニア態窒素が多く含まれ、DIN 分析の技術レベルによっては、DON 濃度を差し引きで求める事が極めて困難になる。従って、分析を計画する段階において、分析対象となる試料中の DON、DOP が TDN、TDP に占める割合をあらかじめ良く把握し、信頼のできる DON と DOP の値を得るために必要とされる、全量と無機態の高精度な分析環境が十分確立されている事を確認するこ

とが肝要である。また、各々の分析環境の確立以外にも、分析全体を通じた配慮も必要である。詳しくは後述するが、ここでは重要なことを 2 点挙げておく。1 つ目は、全量と無機態の分析対象試料については、同一容器に保管されていたものを、分析する際にそれぞれ分割して使用することである。2 点目は、全量と無機態の分析の際に作成する検量線には、同一の標準溶液（原液）を用いる事である。例えば、無機態の値については、ルーチンの栄養塩分析として得られたデータがすでにあるのでそれを有効利用し、自分は全量だけを測定して、両者の差し引きにより DON、DOP を求めるというやり方は、見掛け上正しいかもしれないが、そこには潜在的に誤差を生む要因が多々存在する。栄養塩類のデータがすでに手元にあったとしても、全量を測定する際に、同一の試料、同一の標準溶液を使い、改めて無機態成分（＝栄養塩類）の測定を行うという手間が、信頼のできる DON、DOP の値を得るためには重要といえる。時折、DON、DOP の値をゼロ、あるいは負の値として得ている人を見かけるが、これまで述べてきたような注意点のどこかに問題があることが原因と思われる。負の値は論外として、DOM は地球上の海水中に普遍的に安定して存在し、栄養塩類のようにある環境下においてほぼ枯渇するという特徴を示さない物質である。全量と無機態成分の両測定における分析精度から、DON と DOP の検出下限値を正確に割出し、それに基づいて表記することが求められる。

DOM の元素分析に用いられる酸化分解法には様々なバリエーションがあり、大別すると、①湿式化学酸化法、②紫外線照射酸化法、③高温燃焼酸化法の 3 つの方法が古くから考案、利用されてきた。DOC に関しては、現在でも 3 つの手法が全て市販の機器として利用可能であるが、実際には③の原理を用いた機器が圧倒的に広く普及している。一方、DON に関しては①と③の原理に基づく機器がポピュラーであり、DOP に関しては①の手法が主流である。特に DON と DOP に関しては、①による湿式酸化を受けると、それぞれ、硝酸態窒素、リン酸態リンに変化するので、酸化分解過程を手分析で行った後に、通常の栄養塩分析に準じた測定を行う手法、あるいは、栄養塩類を測定するためのフローインジェクション分析装置（オートアナライザー）に湿式酸化システムをオプションで組み込み、オンライン自動測定する方法などが使われている。特に後者の場合は、DON と DOP のデータを同時に得ることができる。一方、DOM が③による高温燃焼酸化を受けると、条件にも依るが、基本的には、含まれる DOC は二酸化炭素ガス（CO2）、DON は気体の一酸化窒素ガス（NO）に変換されるので（DOP だけは気体にならず、リン酸態リンに変換し燃焼炉内に残存）、この二つの生成気体を連続して測定することにより、DOC と DON の同時測定が可能となる。市販の装置も入手できる。以上のように、酸化分解後の生成物の性質から、DOC は基本的に気体の測定、DOP は溶液中のイオンの測定、DON は気体あるいは溶液中のイオンの測定となり、結局、DOC と DOP の同時測定が技術的に難しくなるため、三元素の同時測定はほとんど普及していない。従って、実際には、DOC を③で測定し、DON と DOP を①で測定する、あるいは、DOC と DON を③で測定し、DOP を①で測定するという 2 通りの組み合わせが最も現実的且つ効率的と考えられる。本章では、DON に対する酸化効率が安定しており、また、使用試薬の種類と量が圧倒的に少なく操作も単純で汚染等のリスクが少ない、後者の組み合わせを用いた分析方法について解説する。なお、海水試料のろ過と試料の保存方法については、3 成分の測定に共通する内容なので、まずそれについて紹介し、続いて高温燃焼酸化法による DOC と DON の測定、最後に湿式化学酸化法による DOP の測定について解説する。また、解説にあたって

は、測定方法の詳しい原理や歴史的な経緯、得られたデータの物質循環的な意義などについては、拙著等があるのでそれらを参照して頂くことにし（小川，1993, 1996, 2000, 2003, 2004, 2007, 2010）、本章ではより実践的な分析マニュアルという視点から解説を行う。

2　濾過と試料の保存

2-1 濾過

海水試料のろ過には、公称孔径（粒子保持能）0.7 μm のガラス繊維濾紙、Whatman®　GF/F を利用するのが世界的な標準である。実験等の都合で、他のタイプのフィルターを使用する場合、孔径が概ね 0.1～1 μm の範囲のものであれば、通常分析値に大きな差は生じないが、有機材質のメンブランフィルター等を用いる場合には、フィルターからの溶出物（特に DOC）に注意が必要である。その場合、試料をろ過する前に十分な超純水（ミリ Q 水等）を使って濾過洗浄し、有機物フリーの人工海水等に対して、ブランクが無視できることを確認しておく必要がある。市販のシリンジフィルターなどについても同様である。ガラス繊維濾紙については、使用前に、1 枚毎アルミホイルで包み、電気炉で空焼き処理（450℃、3 時間）したものを用いる。空焼き処理後、長期間（目安として数か月以上）室内で放置されていたものは、空気中の揮発性有機物等の吸着が懸念されるので、使用は避けた方が無難である。

濾過操作には、採水した試料を実験室内に持込み、一般的な減圧濾過用フィルターホルダー等を用いて行う場合と、甲板上における採水作業時、ニスキン採水器等の採水ボトルの採水口に、GF/F 濾紙を装着したカートリッジ式フィルターホルダーを直接取り付け、採水と同時に濾過を行う場合の大きく二通りの方法がある。後者は、前準備がやや面倒ではあるが、採水しながら直ちに粒状物を除去できる（特に DOM 濃度に影響をもたらす可能性のある浮遊性生物）、濾過の時間を大幅に省略できる、通常の減圧濾過操作時に予期される様々な汚染リスクを回避することができる等、利点が大きいので推奨される。ただし、通常の採水に比べ採水時間がやや増加すること（250 mL 程度の試料量の場合、1 試料につき 5 分程度）、重力濾過であるため、採水器内に十分試料が残っている状態で行わないと効率が落ちる、採水口に直接ホルダー（実際にはホルダーと繋がったシリコンチューブ）を取り付けるため、採水口を汚染させないよう配慮が必要である等（特に微量元素分析用の採水と採水ボトルを共用する場合）、あらかじめ他の採水関係者と十分相談しておくことが重要である。また、甲板上での作業になるため、ホルマリンなどの生物試料固定用の試薬、あるいは、ペンキや喫煙など、有機物の汚染源になる可能性のあるものにも十分注意する必要がある。

著者が実際に使っているカートリッジ式フィルターホルダーは、ポリプロピレン製の市販品で（Advantec 社製、PP-47）、これをベースに適当なサイズのシリコンチューブ、テフロンチューブおよびシリコン栓を組み合わせ、ホルダーの Inlet 側をニスキン採水器の採水口に接続、Outlet 側を 250 mL 容 の細口ガラス試薬瓶（共栓付）の口に接続し、試薬瓶に濾液試料が重力によって採取される仕組みになっている。ホルダーおよびチューブ類一式は、使用前に、全てのパーツを取り外し、①アルカリ洗浄剤にて一昼夜つけ置き洗い、②お湯にて繰り返し濯ぐ、③1N 塩酸溶液にて一昼夜つけ置き洗い、④お湯にて繰り返し濯ぐ、⑤超純水で 3 回濯ぐ、⑥乾燥機（実験器具乾燥専用の清浄なもの）内で乾燥したものを利用する。なお、塩酸溶液は大気中のアンモニアガスを吸収するので、生物試料や堆積物試料などが混在する

雰囲気での使用や、長期間放置されたものを使用すると、逆に洗浄液によって器具を汚すことにもつながりかねないので、使用には十分注意が必要である。細口ガラス試薬瓶については、①～⑥の洗浄過程を行った後に、電気炉で焼成（550℃、5 時間）したものを用いる。ホルダーに濾紙を装着するタイミングは、できるだけ使用する直近に行うのが好ましい。特に、濾紙を装着した後、湿度の高い環境下に長期間放置すると、濾紙が水分を吸収し、重力濾過の際にエアロックが生じることがあるので注意が必要である。使用後のフィルターホルダーは、使用済みの濾紙を取り除きパーツ毎に分解した後、上述した洗浄ステップの④～⑥を行うことによって同一航海内で繰り返し使用しても問題ない。試薬瓶については、④～⑥の洗浄後、適当量のミリQ水を満たした状態で保管し、同一航海内で繰り返し使用可能である。濾過採水を行う際には、ホルダーを通過する初めの 30 秒程度の濾液は捨て、その後試薬瓶を濾液で 3 回共洗いした後、肩口程度まで濾液を満たし、共栓をして実験室に持ち帰る。表面水をバケツ等で採水する場合は、ニスキン採水器の代わりとして、下コック付のポリカーボネートボトル（10-20 L 程度）等に試料を満たし、コックにカートリッジ式フィルターホルダーを取り付けることにより同様な濾過採水を行うことができる。なお、外洋の中深層の試料については、海水中に共存する粒子態有機炭素（POC: Particulate Organic Carbon）濃度が DOC に対して相対的に希薄で、通常は DOC の分析誤差内（一般には±05-1 μM）に含まれてしまうため、手間を要し試料の汚染のリスクも伴う濾過操作を敢えて行わず、未濾過試料に対して測定される全有機炭素（TOC: Total Organic Carbon）の値を DOC のデータとして代用するケースもある。ただし、あくまで DOC に対して POC が無視できることを前提にしているので、仮に、通常より有意に高い値が得られた場合、実際にはそれが、DOC によるものか POC によるものか区別ができなくなるので注意が必要である。

2-2 試料の保存

DOM の元素分析を、船上で採水直後に行うことは技術的に簡単なことではないので、通常は濾液試料を保存し、陸上に持ち帰り分析を行うことになる。保存方法は、一時的な保存でなければ冷凍保存（－30～－20℃）が一般的である。保存容器は、DOC と DON の測定用には、外部からの汚染を完全に遮断するという意味から、焼成済み（550℃、5 時間）のガラスアンプル管（20 mL 容）内に熔封して保存するのが最も安心と言える。ただし、アンプル管をバーナーを用いて熔封する作業は多少熟練が必要で、慣れない人が行うと、封じた部分が容易に割れたり、また、作業に手間取り時間を要していると、高温環境下で窒素酸化物が発生し、これが試料に溶解して亜硝酸イオンの汚染につながる等の恐れがあるで、十分トレーニングを積んだうえで実践に臨むことが肝要である。なお、膨張率の関係で、淡水をアンプル管内で凍結すると、アンプルが破損することがあるので、淡水試料を扱う際には注意が必要である。ガラスアンプル以外に、一般的なガラスバイアル瓶を保存容器に利用している例も多くある（ただしプラスチック製容器は避けた方が良い）。その場合、キャップはポリプロピレン製、パッキンに PTFE などフッ素樹脂がコートされたシリコンゴムを利用するのが良い。使用前に、キャップとパッキンは分離し、上述したカートリッジ式フィルターの洗浄方法に準じて洗浄し、ガラスバイアル本体は電気炉で焼成（550℃、5 時間）して使用する。ただし、冷凍保存する環境によっては、アンモニア、揮発性有機物などによって徐々に汚染が進む可能性があるので、可能な限り専用且つ清浄な雰囲気の（最低限、生物、堆積物試料

等と共有しない環境の）冷凍庫を使い、且つ、保存中に汚染が生じないか事前にチェックが必要である。DOP に関しては、Yoshimura (2013)が、オートクレーブ処理した試料に対して様々なボトルによる長期保存の影響を調べているが、比較的多様な材質の容器いずれに対しても保存による影響は無視できる事を示している。一般的には、比較的安価で破損の恐れも少なく取り扱いがし易いポリプロピレン製の容器が広く使われている。これについても、使用前に上述した洗浄方法により洗浄した後に使用する。なお、(1)濾過の項で述べた、濾液試料を採取したガラス試薬瓶から、上述の各保存容器への分注作業については、5-10 mL 容量のガラスピペット（550 ℃、5 時間焼成済）にシリコン製ニップル（洗浄済）を装着して行うのが、アンプル管のように口が細い容器へ分注する場合便利であり、また、汚染のリスクも軽減できる。一方、DOP の保存容器への分注に関しては、口が広いタイプの容器が使用可能であり、また後述するように、DOC や DON に比べると比較的汚染のリスクも低いので、直接口移しでも構わない。

3、高温燃焼酸化法による DOC と DON の同時測定

3-1　はじめに

高温燃焼酸化法による DOC と DON の同時測定は、基本的には市販の分析装置を利用することになる。簡単な原理は、直前に酸性曝気処理によって DIC を除去した濾液試料を、キャリアガスが流れる高温燃焼炉に一定量注入し、分解生成した CO_2 と NO ガスを、水分、ハロゲンガスを除去した後に、それぞれ非分散型赤外分析計（NDIR: Non-dispersive Infrared detector）、化学発光分析計（CLS: Chemiluminescence detector）によって検出・定量するものである。液体試料用の TOC 分析計に、オプションとして CLS 計を取り付け、液体 C/N アナライザーとして使うケースが一般的のようである。上述したように窒素に関しては、試料中に DIN が共存する場合、前処理によって DON との分離ができないので、ここで得られる値はあくまで TDN であり、別途、同一の試料に対して、オートアナライザー等で測定された DIN の値をここから差し引き DON とする。なお、DIN の分析に関する解説はここでは省略するので“Vol.3 Chap.2: 栄養塩”の章を参照されたい（ただし、上述したように、分析精度については十分な考慮が必要）。また、DOC/TDN 分析装置の具体的な操作方法については、それぞれの装置メーカーのマニュアルに従うことが原則となる。ここでは、一般的な、特に海水試料を測定するために注意が必要な装置の仕様、機器の保守、測定の 3 点について解析を行う。なお、高温燃焼酸化法によって DOC のみの測定を行う場合については、面倒ではあるが、基本的には文中から TDN(DON)に関する記載部分を削除して読んで頂ければ良い。

3-2 装置

① 燃焼カラム（充填触媒）

高温燃焼酸化法では、燃焼炉内に酸化触媒を充填して使用するのが一般的である。1980 年代後半から 1990 年代前半に生じた、いわゆる“DOC 論争”の中では、海水中の DOC の酸化効率に対して、酸化触媒の選定が極めて重要なポイントになるという指摘もされたが、その後の様々な検討・経緯を経て、現在では、DOC の酸化プロセスの主体は高温燃焼酸化で、触媒の種類が結果にクリティカルな問題をもたらすという認識はほとんど薄れていると思わ

れる。現在、市販の機器で最も普及している島津製作所の装置においては、標準触媒として、担体のアルミナ粒に白金をコーティングしたものが提供されているが、これとは別に、“高感度触媒”という、石英ウールに白金をコーティングした、低ブランクを特徴とした製品が提供されている。海水、とりわけ外洋水中の DOC 濃度は希薄であるため、一見、この触媒の選択が好ましいように思われがちであるが、海水試料の場合は使用してはならないので注意が必要である。触媒の形状がウールであるため、海水試料をカラムに注入した後に残存する無機塩類が、カラム内に徐々に蓄積するに従いウールを押し潰し、最終的にキャリアガスが通過できなくなってしまう恐れがある。一方、標準触媒と同様な形状で、無機塩類の蓄積に対してより耐久性を示すタイプの触媒も提供されており、海水試料の場合はこちらを選択する事が推奨される。

② 検出器

DOC の測定に用いられる NDIR 検出器に関しては、基本的に市販の装置に装備されているものは、いずれも海水試料を測定するのに十分な感度を備えているので問題はない。なお、NDIR 内部の光学セルは、ハロゲンガスによる腐食に弱いので、海水試料を測定する場合（海水中の塩化物イオンや臭化物イオンの一部が酸化プロセスによってハロゲンガスに変化）、検出器の前の流路途中でハロゲンを十分トラップする機能が必要となる。一方、DON (TDN) の測定に用いられる CLS 検出器については、装置によって感度が大きく異なる場合があるので、選定には注意が必要である。具体的には、NO ガスとオゾンの化学反応による発光現象が起こる反応槽内部を、減圧するタイプと非減圧のタイプの 2 種類があり、前者は高感度であるため、低濃度の海水試料に対しても問題なく測定できる。ただし、キャリアガスの流量が通常の TOC 計で用いられている流量よりも多く必要になるため、特に市販の TOC 計に、オプション品以外の CLS 計を独自に接続して使用する場合は、流路系に改良を加えなくてはならないので注意が必要である。一方、非減圧タイプの CLS 装置は相対的に感度が劣るため、低濃度海水試料を対象とする場合には十分な感度および精度が得られるか、事前に検討が必要である。因みに、通常測定されている海水試料中で最も TDN 濃度が低いのは、一般に 4-5 μM 程度の濃度範囲を示す亜熱帯海域の表層試料であり、100 μL 容量の試料を注入した場合、絶対量は 0.4-0.5 nmol（=6-7 ng）となる。また、TDN の高温燃焼による生成物の大部分は NO ガスであるが、酸素の存在下では、一部 NO_2 ガスへ酸化される可能性がある。市販の CLS 計では、流路途中に NO_2 を NO に還元するコンバーターが装着され、NO と NO_2 ガスの合計量（NO_x）を測定するための機能を持つ場合が多いので、実際にはそれを利用して NO_x を測定することが望ましい。

③ キャリアガス

キャリアガスは、燃焼酸化で生成した CO_2 と NO ガスをそれぞれの検出器に運ぶ役割を持つ他に、キャリアガス中に含まれる酸素が燃焼時における酸化剤の役割も果たす。通常は高純度空気（酸素 21%）が使われる事が多いが、市販の TOC 計で酸素ガスが利用されている場合、TDN との同時測定に拡張する場合には高純度空気に切り替える方が良い。詳しい理由は省略するが、試料中の硝酸塩が高温燃焼によって NO ガスに変換される反応は、酸化ではなく熱分解であり、その際に酸素が発生するので、高濃度の酸素存在下ではこの反応が阻害さ

れる可能性があるためである。特に海水分析では、TDN の中に占める硝酸塩の割合が高い試料が多いので注意が必要である。

④ オートサンプラー

近年の分析装置の多くは、オートサンプラーを接続して使用するタイプが標準となっている。後述するように、試料を連続測定する間の適当な間隔で、ブランクチェックのための超純水と、感度チェックのための標準溶液を、測定する手順に従いオートサンプラーに適宜並べることが推奨されるが、その場合、試料の汚染に対しては十分な注意が必要である。メーカーによっては、オートサンプラーで使用するバイアル瓶に対して、単にアルミホイルで覆って蓋をする程度の仕様もあるようだが、大気中から揮発成分が容易に溶け込むので好ましくない。汚染を積極的に避けるようなクリーンなセプタム（テフロン系など）を装着する等工夫が必要である。

⑤ その他

海水試料を測定対象とする場合、とりわけ外洋水中の DOC や DON 濃度は極めて低濃度であるため、分析装置自体の他に、周辺装置含めた分析環境の全体的な整備が重要となる。とりわけ、超純水は、カラムのコンディショニング、ブランクチェック、標準溶液の調整、器具の洗浄など、あらゆる過程に不可欠であり、分析装置の周辺において新鮮な超純水が自由に調達できる環境が推奨される。市販の超純水製造装置の中には、カートリッジカラムによる溶存不純成分の除去に加え、紫外線照射による有機物酸化分解機能が組み込まれ、さらに、採取する超純水中の TOC 濃度を紫外線酸化法により簡易測定し、そのデータを表示する機能を有するものがあり、このようなタイプの装置を使える環境は最適といえる。また、分析装置を設置する場所は、生物試料の処理等、臭気の発生する作業場所から十分隔離する必要があり、有機溶媒を頻繁に使用する場所とも可能な限り離すことが望まれる。また、人間も、アンモニア、一酸化窒素（NO）、有機酸、アルデヒドなどの様々な揮発性物質の排出源であり、狭い空間に同時に多数の人が出入りするような環境も適当とは言えない。振動については、特に NDIR の検出器に悪影響を及ぼす可能性があるため、コンプレッサー等振動の発生源を近くに置くことも避けるべきである。

3-3 保守

① 燃焼カラム

各メーカーのマニュアルに従い燃焼カラム内に触媒を充填する際、特に注意が必要な点として、充填触媒の最上部と燃焼管の最上部の間に挟まれたブランクの空間に対する距離（容積）を、マニュアルの指示に従いできるだけ正確に保つことが挙げられる。この空間は、液体試料を注入した際に瞬間的に試料が気化し滞留する場であり、また燃焼炉の炉心から外れた位置にあるので、やや温度が低いエリアでもある。これらのことを考慮し、この空間の容積は、有機化合物の酸化効率や回収率が最適になるように設計されている。一方、使用前の触媒中には、ブランクの主原因となる炭素、窒素が様々な形態で不純物として含まれている。これらは、排水試料等の高濃度試料の分析の際には問題にならない程度であっても、海水試料の濃度レベルでは決して無視できない。このような不純物を十分除去し、ブランクを可能

な限り低いレベルで安定化させるために欠かせないのが、カラムのコンディショニングである。これは、新しく触媒を充填した燃焼カラムを装着した後、装置を通常の試料測定の状態に立ち上げ、超純水を（塩酸を加え pH 1-2 程度の酸性に調整したもの）繰り返し注入する操作である。この処理により、ブランク値は徐々に減少していくが、十分低く且つ一定の値になるまでに、数日程度時間をかけて行う必要がある。一方、著者の経験によると、新しく触媒を充填したカラムを、あらかじめ電気炉を使って通常分析に使用する温度（680 ℃付近）より高い温度で加熱処理することにより（800 ℃、3 時間）、コンディショニングの時間を大幅に短縮できる。触媒によっては温度使用条件がある場合もあるので、それを確認した上で問題なければ取り入れると良い。なお、コンディショニングは、燃焼カラム交換時以外に、日々の分析を行う際にも短時間で構わないので毎回行う方が良い。例えば、分析を行う前日の夜からコンディショニングを始めると、分析日の朝には大抵ブランク値は低く安定しており、すぐに試料の測定に取り掛かることができ、効率的である。カラムの交換時期については、特に測定値に問題がなければ、使用制限回数を固定し強制的に交換する必要はなく使い続けても構わない。海水試料を多数注入することにより、無機塩類がカラム内に蓄積し、それらが原因と考えられる、ブランク値の上昇や不安定化、測定値のばらつき、ピーク形状の変化、ゴーストピークの出現等の症状が頻繁に現れるようになったら直ちに交換する。

② 試料注入部

近年の市販の装置の多くは、試料を一定量採取し燃焼カラムに注入する操作は全て自動化されており、マイクロシリンジを使用して手動で注入するタイプのものはほとんど見かけなくなった。しかし、自動でも手動でも重要なポイントは同じで、注入する試料をカラム内に飛散させることなく、充填触媒の中心部に向かって迅速かつ直線的に注入することである。これは、高温燃焼法において高精度分析を実現するための極めて重要な技術的要素の一つである。試料がカラム内に飛散する、あるいは充填触媒の中心部から離れた付近に注入された場合、試料中の溶存有機物の一部が無機塩類と共にカラム上部の内壁に付着する事が予測される。カラム上部は炉心より温度が低いため、これらはすぐ燃焼酸化されずに、測定値のバラつきの原因になったり、あるいは、時間をかけて徐々に酸化されていくことによりブランク上昇の原因につながったりすることが考えられる。このようなことを避けるために、分析前には必ず、試料注入部を取り外し、注入ニードル付近の汚れ（固着した無機塩類など）を超純水等で流れ落とすことが大事である。そしてマニュアル注入モード等を用いて、注入ニードルから試料が直線的に垂直方向へ注入されているかどうかを良く目視で確認し、問題があれば、ニードルの向き調整、掃除、あるいは新規交換し、理想的な試料注入が安定して行われるよう保守を心がける。

3-4 測定手順

① 試料の準備

冒頭で、DON の測定を TDN と DIN の測定値の差し引きによって求める場合、同一試料を分割し、TDN と DIN の両分析に用いることが肝要であると述べた。従って、凍結保管された試料を解凍して分析を開始する前に、分割後の両成分の分析の進め方について、あらかじめ良く計画を立てておく必要がある。理想的には、試料を分割した後に TDN（DOC/TDN）

と DIN の分析を同時並行で進めることができればベストである。しかし実際には、両者の分析は使用する装置も全く異なり分析手順も大きく異なるため、複数人で作業を進めない限り困難を極めることが容易に想像でき、最終的にデータの質の低下につながることも懸念される。その場合の対処法として、一部の試料を安易に再凍結して分析を後に回すことだけは避け、まずは、試料解凍後に再保存が難しい DIN の分析を優先して進めるのが適切である。そして、DOC/TDN 分析用の試料については、焼成済みの別なアンプルに分注し、6N 塩酸を 1 %添加した後に熔封した状態で冷蔵保管することで、後日単独での分析に専念する事ができる。塩酸添加は、DIC 除去のために元々必要な操作であるのに加え、微生物活性も阻害してくれるため、まさに一石二鳥であり、また、アンプル内に密封することで試料汚染のリスクもない。ただし、あくまでこの保管は一時的なものと心得、試料の解凍・分割後少なくとも 1−2 週間以内には分析を行うよう計画を立てることが好ましい。以上、少なくとも外洋水試料については、上記の手順の後にそれぞれの分析に進むことになるが、一部の沿岸水試料、特に富栄養化が著しく TDN に占めるアンモニア態窒素の寄与が大きい試料については、正確な DON のデータを得るために、アンモニア除去のための前処理を加えることを推奨する。著者の経験によると、海水中に添加したアンモニウムイオンに対する高温燃焼酸化法の酸化効率（回収率）は、高濃度の場合しばしば 100%に満たず安定しないことがある。おそらく、高温下に注入された瞬間にアンモニアガスとして気化し、一部がカラム内部まで到達していないことが考えられるので、DON の分析を目的とする場合は試料中にアンモニア態窒素の量ができるだけ少ない方が好ましい。アンモニアの除去方法については、ここでは詳しくは省略するが、基本的には、試料の pH をあらかじめアルカリ側に調整し（マグネシウム等の水酸化物沈殿が生じない程度に）、真空乾燥器等を利用して（DON の分解を防止するため、できるだけ低温下で）蒸発乾固させることにより、90%以上は除去できる。その後、乾固試料を超純水に再溶解して中和した後に、上記の試料分割のステップに進む。

② DIC の除去

海水中の DIC 濃度は DOC の数十倍以上に達するので、DOC の分析前に DIC を完全に除去する必要があるが、一例として、次のような比較的簡単な操作によってその目的を達成する事できる。5 mL 程度の海水試料に対し 6N 塩酸溶液を 1 %の割合で添加し、流量 30-50 mL 程度の純空気（あるいは純窒素やヘリウム）で 5-10 分程度通気（曝気）を行う。実際には、各装置の特性に基づいた操作方法が決められているので、原則としてはそれに従うことになる。ここでは、特に共通して注意すべき点をいくつか挙げる。一つ目は通気の点であるが、実際に使う容器の形状によっては、通気量が多過ぎると、容器の口付近まで試料が溢れ出てくる場合があり、これは試料の汚染の大きな原因となるので、試料が溢れ出ないように通気量を調整する。特に海水試料の場合、通気によって泡や飛沫が生じ易いので注意が必要である。次に通気前に添加する塩酸に関する注意点であるが、塩酸は大気中のアンモニアガスを吸収し易いので、特に TDN のブランク値に与える影響について注意を払う必要がある。原液はできるだけグレードの高い製品（例：和光試薬、アミノ酸分析用塩酸）を利用し、原液の試薬ボトルは汎用には供せずに当該分析専用とし、開封後はチャック付ポリ袋などに入れて保管する。また、分析時に使用する 6N 塩酸溶液は、作り置きはせずに、毎回使用時に超純水で希釈し調整し、蓋のしっかりした（共栓など）ガラス容器に保管する。DIC を除去するタ

イミングについては、分析待機中における汚染のリスクを避けるためにも、できる限りDOC/TDNの測定直前に行うことが好ましい。DOC/TDNの分析に要する時間は、装置によって多少異なると思われるが、1試料に対し4-5回繰り返し分析を行った場合で約10分程度であり、これにDICの除去過程を加えると15-20分程度かかることになる。一方、1つの試料のDOC/TDNの測定を行っている間に、次の分析試料のDIC除去を同時並行で行えば、DICの除去とDOC/TDN分析を連続して行いつつ、分析時間も短縮することができるので効率的である。オートサンプラーを使用する場合には、この点を留意しながら測定手順をプログラムすると良い。

③ 標準溶液および国際共通標準試料

DOCの分析における標準物質としては生物由来の代表的な天然有機化合物の一つで、且つ親水性、不揮発性の性質を持つグルコースが使われる場合が多い。標準溶液の調整方法としては、あらかじめ高濃度の原液を保存用に作成し、それを毎回分析時に超純水で希釈して検量線作成用の標準溶液を作成する。グルコースの試薬はできるだけ高純度のものを選び、超純水に溶解した後に塩酸酸性としたものを原液とし冷蔵保存する。炭素濃度としておよそ50 mM前後のものを調整しておくと、通常の海水試料を対象とした分析において幅広く使うことができる。また、可能であれば、調整後の保存用原液はガラスアンプルに分注・小分けにして熔封したものを冷蔵保存し、毎回の分析時にはアンプル1本を使い切りとする方法を推奨する（原液の汚染や変質を防ぐため）。ただし、たとえアンプル内密封保存した場合でも1年以上の長期保存は避け、少なくとも半年に1回程度の間隔で新しく原液を作成し更新する事が好ましい。一方、TDN分析に対する標準物質については、外洋の中深層や沿岸水など、TDN中に占める硝酸態窒素の割合が高い試料が多いことを考慮すると、安定な硝酸塩化合物である硝酸カリウムの使用が適当である。これに関して重要なポイントは、必ず、DINの測定時に硝酸態窒素の分析に用いる標準溶液の原液（これに関してもグルコース溶液と同様に、ガラスアンプルに小分けにして保存することが好ましい）と同一のものを利用することである。実際のDOC/TDNの同時分析における検量線作成の際には、これらグルコースと硝酸カリウムの混合標準溶液を調整することとなる。外洋域における表層から中深層までの試料をまとめて測定する場合の検量線の具体例として、DOCに対しては0-100 μMの範囲において約20 μM間隔で6点、TDNは0-60 μMの範囲において約10 μM間隔で6点の検量線を作成すると、その範囲内でほぼ全ての試料の定量が可能である。一方、2000年以降、DOCとTDNの分析のための国際共通標準試料（CRMs: Consensus Reference Materials）の供給システムが（基本的な目的はDOCの分析に対してであり、近年になってTDNにも拡張）、米国のD. Hansell博士の指導の下NSFの資金補助を受けて確立しており、実費＋輸送料程度の負担で誰でも入手することができる（http://yyy.rsmas.miami.edu/groups/biogeochem/CRM.html）。大西洋の深層水（DSW: Deep Sea Water）と（超）純水（LCW: Low Carbon Water）の二種類のセットから成り、それぞれ酸添加した試料がガラスアンプル内に密封された形で提供され、測定技術の信頼できる複数の機関によって得られた公認濃度が付されている。外洋域のDOC関連の論文を国際誌に投稿する際には、これらCRMsに対する測定結果を示すよう求められる場合も多々あるので、是非入手し、毎回の分析毎に少なくとも1回は測定することが推奨される。

④ ブランクの吟味

高温燃焼酸化法は、試薬の使用が少なく操作が簡便で、試料量も少なくて済み、且つ高精度である等、海水中の DOC のルーチン的な測定にとって非常にメリットの多い方法である。その一方で、唯一の欠点として挙げられるのが、海水中の DOC 濃度レベルに対して無視できない大きさのブランクが常在することである。著者の経験によると、上述したカラムのコンディショニングを十分行ったとしても、DOC 濃度にして通常 4-6 μM のブランク値が存在する。これは、外洋海水試料中の DOC の一般的な濃度 35-90 μM に対して、5-20 %に相当する。また TDN については、外洋試料中の一般的な濃度範囲が 4-47 μM であるのに対し、通常その 0.5-20 %に当たる、0.3-0.8 μM 相当のブランク値が得られる（ただし、”(2) 装置”の項で解説したように、使用する CLS 検出器の種類によっては、検出感度が低いため、この濃度レベルの窒素のブランクは検出されない場合もある）。一般的には、分析結果から最終的な濃度を決定する場合、一律のブランク値を差し引くことになるので、一連の測定を通してブランク値が一定であることが、正確なデータを得るために極めて重要となる。従って、標準溶液の測定によって得られた検量線の切片の値のみからブランクを評価するやり方は好ましいとは言えず、試料を測定する際には、一定の間隔でブランク値の測定を挿入することが望まれる。一例として著者の研究室では、通常 5-6 試料の測定間隔において、ブランク値として超純水の測定、合わせて感度チェックのために、一定濃度の標準試料の測定を行う方法を採用している。そして、特にブランク値に有意な変動が認められなければ（DOC では±1 μM 以内、TDN では±0.1 μM 以内が好ましい）、得られたブランクの平均値を使って最終的な濃度計算を行っている。一方、測定を行っている間に、ブランク値の有意な変動やピーク形状の変化等の異常が繰り返し認められる場合は、試料の測定を一旦止め、燃焼カラムのコンディショニング等の処置を行うべきである。なお、ブランク値の測定に用いる超純水については、“(2) 装置”の項で解説した、紫外線照射分解の処理機能をもち、且つ TOC 値のモニターが装備されている装置から供給されるものを使うのが理想であるが、手元にない場合は、装置周辺で入手できる可能な限り純度の高い（超）純水を利用し、上述した CRMs の LCW 試料との比較を行い、有意差があればそれに基づき補正を加えブランク値として使用することもできる。（超）純水は大気に接していると容易に汚染されてしまうので、ブランク測定のためには、可能な限り新鮮なものを使用する必要がある。その一方で、ブランク値の安定性を正しく確認するためには、一連の分析を通じて全く同一の（超）純水を一定間隔で測定することが好ましい。そこで、あらかじめ、分析開始前にブランク測定のために採取した一定量の（超）純水を、ガラスアンプル（焼成済み）に分注し、6N 塩酸を添加後熔封したものを、ブランク測定毎に 1 本ずつ利用する方法が、信頼できるブランク値を得る上でも確実といえる。

4、湿式化学酸化法による DOP の測定

4-1 はじめに

冒頭で解説したように、現在最も広く利用されている海水中の DOP の測定方法は、濾過海水試料にペルオキソ二硫酸カリウム等の酸化剤を加えて加熱分解し、生成する無機態のリン、すなわちリン酸イオンを栄養塩分析と同様、比色分析（モリンブテンブルー法）により

測定するものである。DON の分析と状況は全く同じで、試料中に溶存無機態リン（DIP）が共存している場合、ここで得られる値は全溶存リン（TDP）であり、別途同一試料に対し、酸化分解を行わずに測定された DIP の値を差し引き、DOP を求めることになる。ただし、外洋域の中深層水試料を対象とする場合、その中の DOP は TDP の数%以下、濃度で 0.1 μM 以下と考えられており、TDP に対する一般的な分析精度（±0.02 μM 程度）に極めて近いものになる。従って、実際にはそのような試料中の DOP 濃度を、本法によって正確に測定することは極めて困難であることを、あらかじめ良く理解しておいた方が良い。冒頭で述べたように、湿式酸化法による DOP の測定には、一連の操作を基本的に手分析で行う方法と、栄養塩を測定するためのオートアナライザーに湿式分解システムを組み込み、オンライン自動測定する方法がある。後者については、基本的にはメーカーの提供するプロトコールに従って分析を進めることになるので、ここでは前者の手分析による方法について解析する。なお、栄養塩分析であるリン酸イオンの測定についてはここでは省略するので、“Vol.3 Chap.2: 栄養塩”の章を参照されたい。

3-2 測定手順

湿式化学酸化法には種々の方法があるが、海水試料に対して最も広く使われているのが、硫酸酸性-ペルオキソ二硫酸カリウム加熱分解法である。ここでは、Ridal and Moore (1999)、Yoshimura et al. (2014)で使われている手法を参考に、多少改良を加えた方法を紹介する。なお、DOP の測定は、高温燃焼酸化法を利用する DON の分析とは異なり、全量（TDP）と無機態（DIP）の検出方法が同一であるため、作業を同時並行で進めることができ、計画も立て易く便利である。また、リンを含む化合物の多くは不揮発性なので、試料に対する大気からの汚染のリスクも少なく、DOC や DON の分析と比べると、全体的に個々の操作に対するケアは軽減される。

① 凍結保存試料を解凍後よく振盪させた後に、DIP 測定用と TDP 測定用にそれぞれ分割する。DIP は栄養塩分析のプロトコールに従ってモリブテンブルー法によって測定する。ただし、DIP と TDP の測定の際の検量線作成に用いる標準溶液（原液）は、必ず同一のものを使う。なお、分析精度を担保するためにも以下 TDP の測定は少なくとも各試料に対して 3 連で行うことが望ましい。

② TDP 測定用の試料は、耐熱性ネジロガラス試験管（アルカリ洗剤洗浄＋塩酸洗浄済み）に分注し、酸化分解溶液を試料量に対して 8%の割合で添加する。酸化分解溶液は、（超）純水で調整した 0.225 M の硫酸溶液 100 mL に、ペルオキソ二硫酸カリウム（窒素・リン測定用、和光試薬）5 g を溶かして、毎回使用時に調整する。耐熱性試験管のキャップはオートクレーブ使用可能な材質を選び、内蓋はテフロンコーティングされたものを用いる。

③ 試料はキャップを締めて良く混合した後、オートクレーブで 125℃、2 時間加熱する。なお、オートクレーブは可能な限り、化学分析専用のものを使用する。特に、微生物培養用の培地などを滅菌するために利用されているオートクレーブを共用した場合、内部で無視できない量のリンに汚染されることがあるので要注意である。あらかじめ、ブランク実験を行い、オートクレーブ内での汚染がないか確認しておくことが望ましい。汚染が確認され、オートクレーブ内部を洗浄しても汚染が除去できない場合は、ネジロガラ

ス試験管の代わりにガラスアンプル内に封入する方法を採用すると良い。

④ 酸化分解処理によって海水中の塩化物イオンが酸化され多量の塩素ガスが発生する。これは、モリブテンブルー法による比色分析を妨害するため、オートクレーブ処理後のガラス試験管は開栓後、ウォーターバス内で湯浴し 2 時間ほど放置することにより塩素ガスを試料中から追い出す。なお、この操作はドラフト内で行う必要がある。

⑤ その後 DIP と同じ方法でモリブテンブルー法によるリン酸イオンの測定を行い、得られた値から DIP の値を差し引き、DOP 濃度を求める。

⑥ 検量線に用いる標準溶液（リン酸二水素カリウム溶液）については、基本的に、試料と同じく酸化分解溶液を添加し、オートクレーブ処理したものを用いる。標準溶液は、あらかじめ人工海水を作成し、それを用いて標準溶液の原液を希釈して調整する。なお、DOC や TDN で利用されているような CRMs の国際的な配布システムは、DOP（TDP）に関しては今のところ確立されていない。Yoshimura and Sharp (2010)によって、現在、栄養塩に対して確立されている国際標準試料が、この目的にも利用できないか検討がされたが、ロット間のバラツキが大きく適当ではないとの結論が得られている。全球レベルでの DOP の分布を明らかにする上でも、早急な体制の確立が望まれる。

引用文献

小川浩史(1993): 海水中の溶存有機炭素－測定方法の現状と問題点－, 資源と環境, 2, 13-32.

小川浩史(1996): 高温触媒酸化法による海水中の溶存有機炭素の測定, 月刊海洋, 半田暢彦教授退官記念号, 63-68.

小川浩史(2000): 地球上の炭素循環における海洋の溶存有機物の役割, ぶんせき, 305, 265-271.

小川浩史(2003): 海水中の溶存有機炭素の測定, ぶんせき, 340, 176-182.

小川浩史(2004): 海水中の有機物定量, 先端の分析法－理工学からナノ・バイオまで－, エヌ・ティー・エス

小川浩史(2007): 環境測定の実例－水環境－有機物, 実験化学講座第 5 版:20-2 環境化学, 309-319, 丸善

小川浩史(2010): 海洋調査分析－有機炭素, 窒素, 環境分析ガイドブック, 日本分析化学会 編, 559-563, 丸善

Ridal, J. J., and R. M. Moore (1999): A re-examination of the measurement of dissolved organic phosphorus in sweater. Mar. Chem., 29, 19-31.

Yoshimura, T., and J. Sharp (2010): Additional calibration of nutrients reference materials for dissolved organic carbon, nitrogen, and phosphorus. p. 91-100. In Comparability of nutrients in the world's ocean, edited by M. Aoyama, Mother Tank

Yoshimura, T. (2013): Appropriate bottles for storing sweater samples for dissolved organic phosphorus (DOP) analysis: A step toward the development of DOP reference materials. Limnol. Oceanogr.:Methods., 11, 239-246.

Yoshimura, T., J. Nishioka, H. Ogawa, K., Kuma, H. Saito, and A. Tsuda (2014): Dissolved organic phosphorus production and decomposition during open ocean diatoms in the subarctic Pacific. Mar. Chem., 165, 46-54.

DUMMY

担当編集者一覧

編集委員会委員長　河野　健

Vol.1 担当　内田裕
　　青山道夫

Vol.2 担当　中野俊也
　　小畑元

Vol.3 担当　小畑元
　　中野俊也

Vol.4 担当　小川浩史
　　齊藤宏明

Vol.5 担当　成田尚史
　　青山道夫

Vol.6 担当　齊藤宏明

Vol.7 担当　小埜恒夫
　　中野俊也

Vol.8 担当　内田裕
　　中野俊也

Vol.9 担当　青山道夫
　　小埜恒夫

Vol.10 担当　太田秀和
　　宮尾孝

This page left intentionally blank

書名　　海洋観測ガイドライン
　　第三巻　採水分析（溶存態）
編集者　日本海洋学会海洋観測ガイドライン編集委員会
発行者　日本海洋学会
発行日　2015 年 9 月　第 1 版
ISBN 978-4-908553-02-8

ISBN 978-4-908553-02-8